

Załącznik nr 2



Jakub Piwowarski

Autoreferat

Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 2017



Część badań finansowana była w ramach projektu
Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
Iuventus Plus 0622/IP1/2016/74



W trakcie prowadzenia badań byłem stypendystą
Fundacji na rzecz Nauki Polskiej
START 084.2016



Część prac została przeprowadzona w ramach stażu badawczego
na Uniwersytecie Medycznym w Wiedniu
finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu
ETIUDA 3/08/T/NZ7/00011

1. Jakub Piwowarski

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

Dyplom magistra farmacji – uzyskany w dniu 31 marca 2010 roku na podstawie obronionej pracy magisterskiej „Aktywność hamująca hialuronidazę wyciągów z surowców garbnikowych stosowanych w medycynie ludowej w terapii choroby hemoroidalnej” wykonanej w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotor: dr hab. Małgorzata Kozłowska-Wojciechowska, opiekun: dr n. farm. Anna K. Kiss.

Stopień doktora nauk farmaceutycznych – nadany w dniu 17 czerwca 2015 roku uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego na podstawie obronionej rozprawy doktorskiej pt. „Ziele krwawnicy (*Lythri herba*)- określenie wpływu wyciągu, izolowanych elagotanoidów oraz ich metabolitów na prozapalne funkcje neutrofilii”. Promotor: dr hab. n. farm. Anna K. Kiss, recenzenci: dr hab. n. farm. Michał Tomczyk, dr hab. n. med. Marta Cześniakiewicz-Guzik. Praca obroniona z wyróżnieniem *summa cum laude*.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

od 10.2015 – obecnie – adiunkt naukowo-dydaktyczny w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

07.2010 – 09.2015 – pracownik inżynieryjno-techniczny w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym.

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Rola metabolitów mikrobioty jelitowej w aktywności biologicznej elagotanoidów.

b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

P1. Granica, S., **Piwowarski, J.P.***, Kiss, A.K. (2015): Ellagitannins modulate the inflammatory response of human neutrophils *ex vivo*, *Phytomedicine* 22:1215-1222 (IF₂₀₁₅ = 2.937, 40 pkt MNiSW)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i wykonaniu badań aktywności przeciwzapalnej elagotanoidów oraz udziale w przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

P2. Granica, S., Kłębowska, A., Kosiński, M., **Piwowarski, J.P.**, Dudek, M.K., Kaźmierski, S., Kiss, A.K. (2016): Effects of *Geum urbanum* L. root extracts and its constituents on polymorphonuclear leucocytes functions. Significance in periodontal diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 188: 1-12. (IF₂₀₁₅ = 3.055, 40 pkt MNiSW)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu części badań dotyczących wpływu wyciągów i geminy A na uwalnianie reaktywnych form tlenu, elastazy, produkcję cytokin oraz apoptozę neutrofilii a także udział w przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

P3. **Piwowarski, J.P.***, Granica, S., Stefańska, J., Kiss, A.K. (2016): Differences in metabolism of ellagitannins by human gut microbiota *ex vivo* cultures. *Journal of Natural Products* 73: 3022-3030 (IF₂₀₁₅ = 3.662, 35 pkt MNiSW)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej, oraz przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

P4. **Piwowarski, J.P.***, Stanisławska, I., Granica, S., Stefańska, J., Kiss, A.K. (2017) Phase II Conjugates of Urolithins Isolated from Human Urine and Potential Role of β -glucuronidases in Their Disposition. *Drug Metabolism and Disposition* DOI: 10.1124/dmd.117.075200 (IF₂₀₁₅ = 3.210, 30 pkt MNiSW)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej (badanie hydrolizy glukuronidów urolityn), opiece merytorycznej podczas wykonywania części badań izolacyjnych, określeniu struktur oraz przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

P5. Piwowarski, J.P.*, Kiss, A.K., Granica, S., Moeslinger, T. (2015): Urolithins, gut microbiota-derived metabolites of ellagitannins, inhibit LPS-induced inflammation in RAW 264.7 murine macrophages. *Molecular Nutrition & Food Research* 59: 2168-2177 (IF₂₀₁₅ = 4.551, 45 pkt MNiSW)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej, oraz przygotowaniu manuskryptu opisującego uzyskane wyniki. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

P6. Piwowarski, J.P., Bobrowska-Korczak, B., Stanisławska, I., Bielecki, W., Wrzesien, R., Granica, S., Krupa, K., Kiss, A.K. (2016): Evaluation of the effect of *Epilobium angustifolium* aqueous extract on LNCaP cell proliferation in in vitro and in vivo models. *Planta Medica*, DOI: 10.1055/s-0043-109372 (IF₂₀₁₅ = 1.990, 25 pkt MNiSW).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części badań dotyczących oznaczania metabolitów w moczu i kale zwierząt, oznaczania metabolitów w moczu ochotników oraz przeprowadzeniu badań ex vivo metabolizmu wyciągów i związków pod wpływem mikrobioty jelitowej. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

P7. Kiss, A.K., Piwowarski, J.P. (2016): Ellagitannins, gallotannins and their metabolites- the contribution to the anti-inflammatory effect of food products and medicinal plants. *Current Medicinal Chemistry* DOI: 10.2174/0929867323666160919111559 (IF₂₀₁₅ = 3.455, 35 pkt MNiSW).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu części dotyczącej metabolizmu garbników i aktywności przeciwzapalnej metabolitów. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

*- prace w których występowałem w roli autora korespondencyjnego

Sumaryczny współczynnik oddziaływania *Impact Factor* (IF) publikacji wytypowanych do cyklu w postępowaniu habilitacyjnym wynosi 22.860, punkty MNiSW – 250

- c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Wiedza na temat roli mikrobioty jelitowej w utrzymaniu homeostazy organizmu człowieka w ostatnich latach zaczęła się dynamicznie rozwijać. Uważa się, że jej aktywność ma kluczowe znaczenie dla zdrowia szczególnie poprzez wpływ na układ immunologiczny, układ nerwowy oraz metabolizm substancji odżywczych i ksenobiotyków.¹ Wyniki badań dotyczących zmian w strukturze przyjmowanych doustnie związków pod wpływem mikrobioty jelitowej spowodowały, że przy ocenie wpływu na organizm człowieka substancji występujących w żywności oraz lekach obecnie niezbędne jest uwzględnianie aktywności biologicznej metabolitów powstających w jelicie.²

Jedną z grup związków podlegających istotnym zmianom strukturalnym pod wpływem mikrobioty jelitowej są elagotanoidy, będące wielkocząsteczkowymi polifenolami, które występują w wielu roślinnych surowcach leczniczych takich jak: ziele wiązówki błotnej (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.), ziele bodziszka łąkowego (*Geranium pratense* L.), ziele bodziszka cuchnącego (*Geranium robertianum* L.), korzeń i kłącze kuklika pospolitego (*Geum urbanum* L.), ziele krwawnicy pospolitej (*Lythrum salicaria* L.), ziele pięciornika gęsiego (*Potentilla anserina* L.), kłącze pięciornika kurze ziele (*Potentilla erecta* (L.) Raeusch.), kora dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.), liść maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.) oraz liść jeżyny fałdowanej (*Rubus fruticosus* L.).³ Elagotanoidy są również składnikiem produktów spożywczych tj. orzechów włoskich, migdałów, soku z granatu, malin, truskawek, czy dojrzewającego w beczkach dębowych wina. Biodostępność tych związków w stanie niezmiennym, ze względu na wielkocząsteczkową budowę oraz hydrofilny charakter i podatność na hydrolizę nie jest w pełni ustalona lub nawet uznawana za wątpliwą. Wiadomo jednak, że elagotanoidy ulegają metabolizmowi pod wpływem mikrobioty jelitowej do pochodnych dibenzo[*b,d*]piran-6-onu - urolityn, które w przeciwieństwie do elagotanoidów są małowcząsteczkowymi, lipofilnymi związkami o dobrze udokumentowanej biodostępności, mogącymi osiągać stężenia mikromolarne we krwi, tkankach, kale oraz moczu.^{4, 5}

W badaniach *in vivo* dla podawanych doustnie bogatych w elagotanoidy produktów pochodzenia roślinnego stwierdzono korzystny wpływ na schorzenia, których etiologia związana jest z występowaniem przewlekłego stanu zapalnego. Szczególnie podkreślane są pozytywne efekty na układ krążenia oraz nieswoiste stany zapalne jelita grubego, a ze względu na wykazany w ostatnich latach metabolizm elagotanoidów przez mikrobiotę jelitową, postuluje się, że za obserwowane działanie odpowiedzialne mogą być powstające w jelicie urolityny.^{6,7}

Prowadząc badania nad surowcami roślinnymi bogatymi w elagotanoidy należy mieć na uwadze nie tylko doustne stosowanie, ale również nie można pominąć znaczenia ich przetworów w miejscowym leczeniu schorzeń skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym.⁸ Ze względu na problemy analityczne (trudności w izolacji, skomplikowane struktury) niewiele jest danych na temat składu surowców roślinnych zawierających elagotanoidy. Ponieważ mylnie sądzono, że związki tego typu działają jedynie poprzez niespecyficzne wiązanie się z białkami, liczba badań *in vitro* próbujących wyjaśnić mechanizmy biologicznej aktywności również jest ograniczona.

Prace badawcze prowadzone przeze mnie przed uzyskaniem stopnia doktora skupione były na ocenie aktywności przeciwzapalnej stosowanych zewnętrznie wyciągów z surowców roślinnych bogatych w elagotanoidy (głównie na ziele krwawnicy pospolitej) oraz na sprawdzeniu ich metabolizmu pod wpływem mikrobioty jelitowej połączonym z oceną właściwości przeciwzapalnych *in vitro* powstałych metabolitów - urolityn.

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe dotyczy pogłębienia wcześniej prowadzonych badań poprzez skupienie się nie tyle na wyciągach roślinnych, co na poszczególnych elagotanoidach z nich wyizolowanych, zarówno pod względem aktywności przeciwzapalnej jak i ich metabolizmu pod wpływem mikrobioty jelitowej człowieka. Badania aktywności biologicznych urolityn natomiast poszerzyłem o ocenę molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za ich wpływ na procesy zapalne w komórkach układu odpornościowego oraz podjąłem próby wyjaśnienia nieścisłości związanych z ich metabolizmem pod wpływem enzymów II fazy.

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe dotyczy weryfikacji następujących hipotez badawczych:

- Zewnętrzne zastosowanie bogatych w garbniki substancji roślinnych ze względu na przypisywane im działanie przeciwzapalne w schorzeniach skóry i błon śluzowych, doprowadziło do postawienia hipotezy **H1**, że izolowane z nich elagotanoidy mogą być odpowiedzialne za obserwowaną aktywność poprzez zależny od struktury wpływ na odpowiedź zapalną ludzkich neutrofilii [**P1 i P2**].
- Strukturalna różnorodność elagotanoidów oraz międzyosobnicze różnice w składzie i aktywności mikrobioty jelitowej, doprowadziły do postawienia hipotezy **H2**, że poszczególne elagotanoidy są w różnym zakresie metabolizowane przez mikrobiotę jelitową do urolityn, oraz w zależności od osobnika, powstaje z nich odmienna kompozycja metabolitów [**P3**].
- Zaobserwowanie powstawania znacznych ilości metabolitów elagotanoidów w kulturach *ex vivo* mikrobioty jelitowej człowieka, doprowadziło do postawienia hipotezy **H3**, że poprzez zwiększenie skali hodowli, można uzyskać urolityny w ilościach wystarczających do użycia ich w badaniach aktywności biologicznej *in vitro* [**P3**].
- Wykazanie obecności znacznych ilości metabolitów II fazy urolityn w moczu ochotnika spożywającego produkty spożywcze bogate w elagotanoidy, doprowadziło do postawienia hipotezy **H4**, że stosując metody chromatograficzne można wyizolować z moczu sprzężone metabolity urolityn w ilościach odpowiednich do określenia ich struktur jak i przeprowadzenia badań aktywności biologicznej *in vitro* [**P4**].
- Obecność urolityn w osoczu, tkankach oraz moczu głównie w formie sprzężonej z kwasem glukuronowym oraz wzięcie pod uwagę wydzielania β -glukuronidaz przez komórki układu odpornościowego w miejscach objętych stanem zapalnym i/lub nowotworzeniem a także przez bakterie *Escherichia coli*, doprowadziły do postawienia hipotezy **H5**, że glukuronidy urolityn mogą ulegać hydrolizie enzymatycznej do aktywnych biologicznie wolnych aglikonów bezpośrednio w miejscu objętym stanem zapalnym,

nowotworzeniem lub infekcją pod wpływem obecnych tam β -glukuronidaz [P4].

- Przypisywana tradycyjnie oraz wykazana w badaniach *in vivo* skuteczność terapeutyczna przyjmowanych doustnie bogatych w elagotanoidy substancji roślinnych w przewlekłych chorobach o podłożu zapalnym, doprowadziła do postawienia hipotezy **H6**, że produkowane przez mikrobiotę jelitową biodostępne metabolity elagotanoidów - urolityny mogą wpływać na molekularne mechanizmy odpowiedzi zapalnej makrofagów linii RAW 264.7 [P5].
- Przypisywana tradycyjnie ziele wierzbowki kiprzyicy (*Epilobium angustifolium* L.) aktywność hamująca łagodny przerost gruczołu krokowego doprowadziła do postawienia hipotezy **H7**, że podawanie standaryzowanego wyciągu wodnego szczurom z implantowanymi komórkami nowotworu prostaty LNCaP będzie prowadziło do zahamowania rozwoju gruczolaka, za co odpowiedzialny może być dominujący w wyciągu elagotanoid oenoteina B oraz powstające w jelicie biodostępne metabolity elagotanoidów [P6].

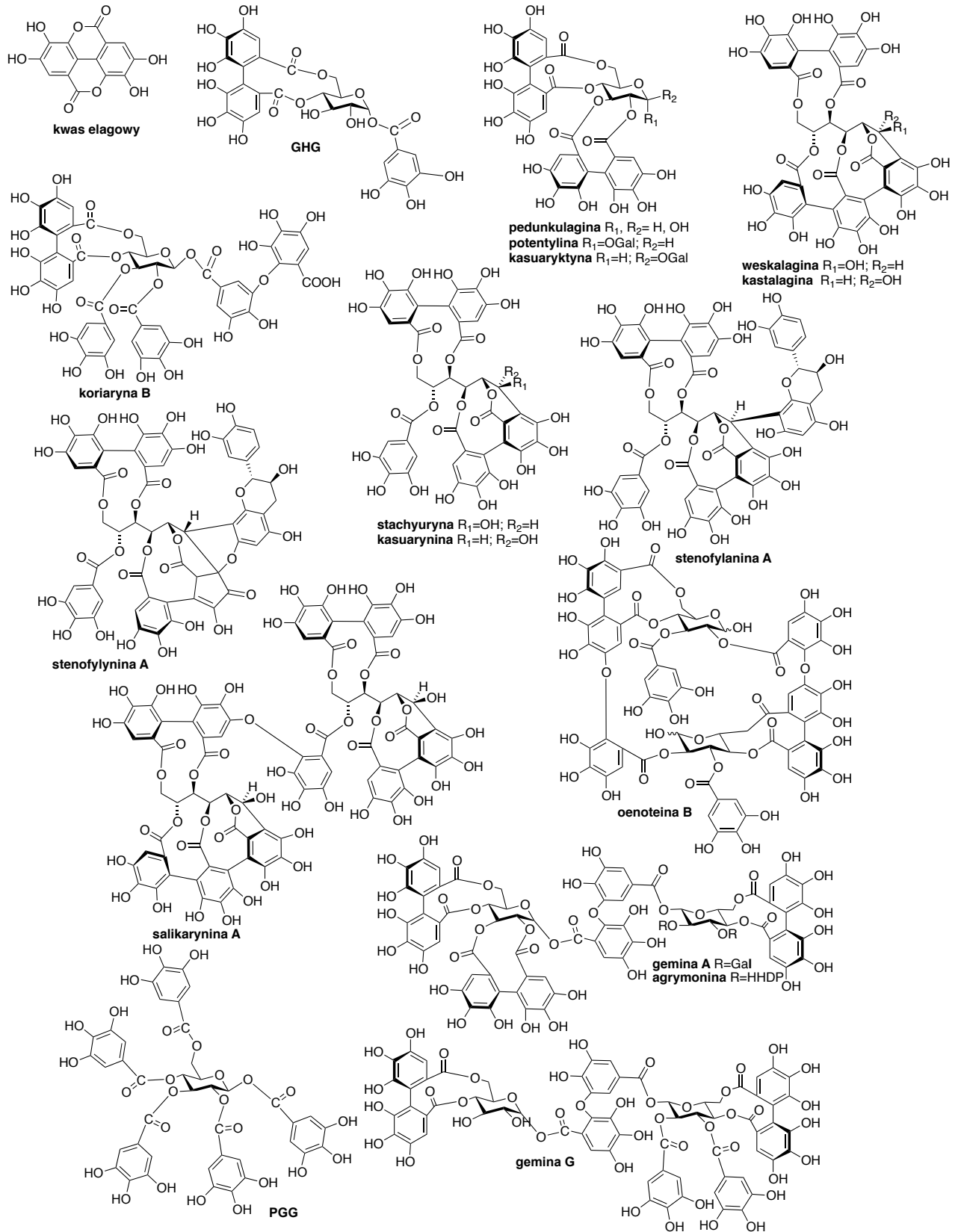
W skład cyklu wchodzi również praca przeglądowa dotycząca udziału metabolitów mikrobioty jelitowej w aktywności przeciwzapalnej roślin leczniczych zawierających garbniki hydrolizujące [P7].

Weryfikacja hipotezy H1.

Ocena wpływu izolowanych garbników na odpowiedź zapalną ludzkich neutrofili *ex vivo*. [P1 i P2]

Wyciągi wodne z bogatych w garbniki substancji roślinnych są tradycyjnie stosowane miejscowo na skórę i błony śluzowe ze względu na przypisywane im właściwości przeciwzapalne. Napary i odwary przygotowywane z surowców bogatych w garbniki takich jak kora dębu (*Quercus* sp.), korzeń i kłącze kuklika pospolitego (*Geum urbanum* L.), ziele krwawnicy (*Lythrum salicaria* L.), kłącze pięciornika kurze ziele (*Potentilla erecta* L.), ziele rzepiku (*Agrimonia eupatoria* L.) są szczególnie chętnie stosowane miejscowo w chorobach skóry i błon śluzowych w formie okładów, płukanek i nasiadówek mających na celu zahamowanie infekcji oraz stanu zapalnego.⁸⁻¹¹

W trakcie prac badawczych prowadzonych przed uzyskaniem stopnia doktora wyizolowałem z korzenia i kłącza kuklika pospolitego, ziela krwawnicy pospolitej oraz ziela pięciornika wyprostowanego (*Potentilla recta* L.) szereg związków należących do grupy elagotanoidów [O7, O10, O16]. Do badań włączyłem również inne elagotanoidy, które zostały wyizolowane podczas prac badawczych prowadzonych przez dr hab. Sebastiana Granicę oraz dr hab. Annę Kiss. Wytypowałem 13 elagotanoidów: 1-O-galoilo-4,6-(S)-HHDP- β -D-glukozę (GHG), pedunkulaginę, stachyurynę, kazuaryninę, weskalaginę, kastalaginę, stenofylinę A, oenoteinę B, geminę G, geminę A, agrymoninę, salikaryninę A, salikaryninę B oraz będącą biogenetycznym prekursorem elagotanoidów penta-O-galoilo- β -D-glukozę (PGG) (**Rycina 1**).



Rycina 1. Struktury garbników wybranych do badań.

Celem prac było porównawcze zbadanie wpływu izolowanych elagotanoidów na odpowiedź zapalną ludzkich neutrofilów, co umożliwiłoby podjęcie próby wskazania strukturalnych cech warunkujących ich biologiczną aktywność. Aby sprawdzić jaką rolę pełnią elagotanoidy w aktywności biologicznej wyciągu roślinnego zawierającego również inne typy związków, przeprowadziłem badania wpływu wyciągu wodnego z korzenia i kłącza kuklika pospolitego (GURR) na odpowiedź zapalną ludzkich neutrofilów połączoną ze zbadaniem scharakteryzowanych fitochemicznie frakcji o różnych polarnościach oraz dominującego w wyciągu elagotanoidu - geminy A.

Wpływ wyciągu, frakcji i związków na indukowane N-formylometionino-leucylo-feniloalaniną (f-MLP) i cytochalazyną B zwiększone uwalnianie reaktywnych form tlenu (RFT) oceniłem metodą luminescencyjną. Wszystkie badane elagotanoidy w stężeniach 1-20 μM w zależności od stężenia działały hamująco na uwalnianie RFT. Zahamowanie uwalniania RFT obserwowane było również dla GURR w stężeniach 5-50 $\mu\text{g/mL}$. Badania porównawcze poszczególnych frakcji i geminy A wykazały jednak, że najsilniejszą aktywność posiadała frakcja octanu etylu, w której zawartość geminy A nie była największa. Można zatem przypuszczać, że za obserwowaną aktywność wyciągu odpowiedzialna jest nie tylko gemina A, lecz również inne związki występujące w wyciągu.

Wpływ wyciągu, frakcji i związków na indukowane f-MLP i cytochalazyną B zwiększone uwalnianie elastazy oceniłem metodą kolorymetryczną z użyciem N-sukcynylo-alanylo-alanylo-valino p-nitroanilidu (SAAVNA) jako substratu. PGG oraz wszystkie dimeryczne elagotanoidy oprócz oenoteiny B w stężeniu 20 μM hamowały uwalnianie elastazy. GURR w stężeniu 50 $\mu\text{g/mL}$ również hamował uwalnianie elastazy. Mimo, że gemina A wykazywała inhibicję w stężeniu 50 μM , to najaktywniejszą okazała się frakcja eterowa, w której ten związek nie występował.

Wpływ wyciągu, frakcji i związków na indukowaną lipopolisacharydem (LPS) zwiększoną produkcję interleukiny 8 (IL-8), czynnika martwicy nowotworu (TNF- α) oraz metaloproteinazy macierzy-9 (MMP-9) oceniłem przy użyciu testów ELISA.

Wszystkie badane elagotanoidy hamowały produkcję IL-8, jednak poziom inhibicji charakteryzował się dużym zróżnicowaniem. Kasuarynina była jedynym związkiem, który wykazywał aktywność w całym zakresie badanych stężeń (1-20 μM), natomiast PGG działała najsilniej spośród badanych związków w stężeniu 20 μM . Dimeryczne elagotanoidy - oenoteina B, gemina A, gemina G i agrymonina wykazywały działanie jedynie w najwyższym badanym stężeniu - 20 μM . GURR był

nieaktywny, natomiast produkcja tej cytokiny była hamowana przez frakcję butanolową i frakcję octanu etylu w stężeniach 10 i 50 $\mu\text{g/ml}$, co korelowało z zawartością geminy A w poszczególnych frakcjach.

Spośród badanych związków jedynie gemina A, agrymonina i salikarinina B hamowały produkcję MMP-9 w stężeniu 20 μM . Zahamowanie w przypadku geminy A w stężeniu 50 μM było umiarkowane i obserwowane na poziomie 25,4%, natomiast ani GURR, ani poszczególne frakcje nie wykazywały takiej aktywności.

Indukowana lipopolisacharydem produkcja TNF- α hamowana była jedynie przez PGG, natomiast pozostałe związki, szczególnie dimeryczne elagotanoidy zwiększały produkcję tej cytokiny. Taki sam efekt obserwowałem również dla GURR oraz frakcji octanu etylu i butanolowej, co mogło być związane z obecnością w nich geminy A.

Wpływ wyciągu, frakcji i związków na zahamowaną lipopolisacharydem apoptozę neutrofilii oceniałem przy użyciu cytometrii przepływowej po barwieniu neutrofilii jodkiem propidyny i znakowaniu aneksyną V. Wykazałem, że obserwowany efekt zwiększonego wydzielania TNF- α był prawdopodobnie związany ze stwierdzonym dla dimerycznych elagotanoidów działaniem indukującym apoptozę. Zarówno GURR, jak i poszczególne frakcje pobudzały zahamowaną lipopolisacharydem apoptozę neutrofilii. Aktywność ta w przypadku polarnych frakcji korelowała z zawartością geminy A, natomiast w przypadku frakcji eterowej odpowiedzialne za to działanie były prawdopodobnie niskocząsteczkowe pochodne kwasu elagowego i galusowego, które były dominującymi związkami w badanej frakcji.

Przeprowadzone badania udowodniły, że PGG jak i elagotanoidy wpływają na odpowiedź zapalną ludzkich neutrofilii *in vitro*. Wykazałem różnice w aktywności poszczególnych związków, które szczególnie widoczne były pomiędzy monomerycznymi a dimerycznymi elagotanoidami. Stwierdzony wpływ elagotanoidów na procesy związane z progresją stanu zapalnego uzasadnia miejscowe zastosowanie surowców roślinnych zawierających garbniki w terapii stanów zapalnych skóry i błon śluzowych. Mimo różnic w aktywności poszczególnych związków otrzymane wyniki nie pozwalają jednak na jednoznaczne wskazanie, które elementy ich struktury są odpowiedzialne za obserwowane działanie. Natomiast badania przeprowadzone na scharakteryzowanym fitochemicznie GURR oraz frakcjach o różnej polarności, mimo, że wskazują na znaczny udział geminy A w ich

aktywności hamującej odpowiedź zapalną neutrofilii, nie wykluczają istotnego udziału innych elagotanoidów jak i związków należących do innych grup.

Weryfikacja hipotezy H2

Różnice w metabolizmie elagotanoidów w kulturach *ex vivo* mikrobioty jelitowej człowieka. [P3]

Elagotanoidy są składnikami wielu produktów spożywczych a preparaty i przetwory uzyskiwane z bogatych w elagotanoidy roślin leczniczych również często co zewnętrznie są stosowane doustnie w terapii schorzeń związanych z występowaniem przewlekłego stanu zapalnego. Badania *in vivo* i *ex vivo* jasno wskazują, że występujące w tych produktach elagotanoidy są metabolizowane przez mikrobiotę jelitową do niskocząsteczkowych pochodnych dibenzo[*b,d*]piran-6-onu - urolityn. Ze względu na dobrą biodostępność powstających w jelicie grubym urolityn, obecnie uważa się, że są one odpowiedzialne za prozdrowotne efekty przyjmowanych doustnie produktów pochodzenia naturalnego zawierających elagotanoidy.⁵ O ile dla produktów spożywczych i przyjmowanych doustnie wyciągów roślinnych przeprowadzono wiele badań dotyczących metabolizmu przez mikrobiotę jelitową^{3,4}, o tyle metabolizm poszczególnych elagotanoidów nie został dotychczas poznany.

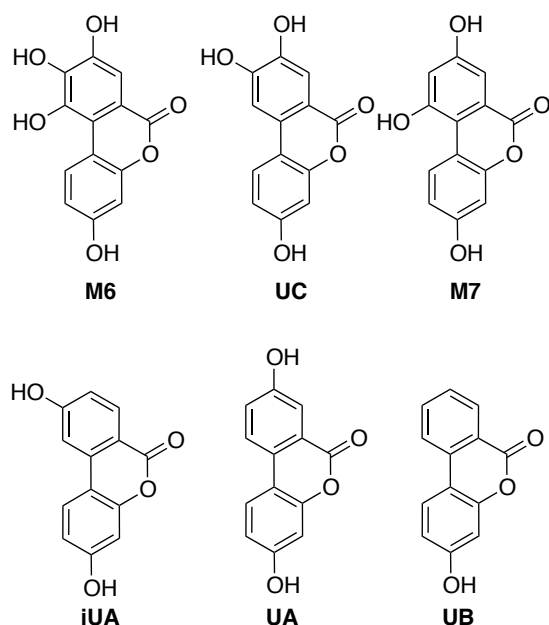
Celem badań było bezpośrednio wykazanie, że izolowane elagotanoidy są metabolizowane przez mikrobiotę jelitową człowieka do urolityn. Ponieważ elagotanoidy są strukturalnie zróżnicowaną grupą związków, a mikrobiota jelitowa wykazuje znaczne międzyosobnicze różnice, celem prac było również porównawcze zbadanie metabolizmu poszczególnych elagotanoidów przez mikrobiotę jelitową pobraną od różnych dawców.

Do badań wybrałem 15 elagotanoidów reprezentujących charakterystyczne cechy strukturalne występujące w obrębie tej grupy związków (**Rycina 1**):

1-O-galoilo-4,6-(S)-HHDP- β -D-glukoza (GHG), pedunkulagina, potentilina, kasuariktina i koriarina B będące monomerycznymi elagotanoidami z grupami galoilowymi i heksahydroksydifenowymi przyłączonymi do glukozy w formie piranozowej; C-glukozydowe elagotanoidy reprezentowane przez weskalaginę i stachyurynę oraz odpowiadające im anomery - kastalaginę i kasuaryninę; garbniki mieszane - stenofylinina A i stenofylanina A - elagotanoidy mające przyłączoną C-glikozydowo cząsteczkę flawan-3-olu do otwartego pierścienia glukozy w pozycji C1; salikaryninę A będącą dimerycznym C-glukozydowym elagotanoidem; dimeryczne

elagotanoidy posiadające glukozę w formie pierścieni piranozowych - geminę A oraz agrymoninę oraz makrocykliczny, dimeryczny elagotanoid - oenoteinę B. Do badań włączyłem również kwas elagowy (EA) jako produkt hydrolizy elagotanoidów posiadających grupę heksahydroksydifenową.

Próbki kału pobrane od trzech zdrowych ochotników (D1-D3) posłużyły do inokulacji podłoży hodowlanych zawierających poszczególne związki w stężeniu 250 μ M, które następnie inkubowałem w warunkach beztlenowych przez 48h. Skład metabolitów w hodowlach pod względem jakościowym i ilościowym po 24 i 48h analizowałem z użyciem ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem diodowym i spektrometrem mas (UHPLC-DAD-MS/MS). Obecność poszczególnych metabolitów: urolityny M6 (M6), urolityny C (UC), izomeru urolityny M6 (iM6), izomeru urolityny C (iUC), urolityny M7 (M7), izourolityny A (iUA), urolityny A (UA), oraz urolityny B (UB) (**Rycina 2**) w poszczególnych hodowlach została przedstawiona w Tabeli 1.



Rycina 2. Struktury oznaczanych metabolitów elagotanoidów – urolityn.

		EA	M6	UC	iM6	iUC	M7	iUA	UA	UB
D1	EA	+/+	+/+	+/+			+/+		+/+	
	GHG						+/+	+/-	+/+	+/+
	pedunkulagina		+/-	+/-			+/+	+/-	+/+	+/+
	potentylina		+/-	+/-			+/+	+/-	+/+	+/+
	kasuaryktyna		+/-	+/-			+/+	+/-	+/+	+/+
	koriaryna B		+/-	+/-			+/+	+/-	+/+	+/+
	weskalagina		+/-	+/-			+/+		+/+	+/+
	kastalagina		+/-	+/-			+/+		+/+	+/+
	stachyryna		+/-	+/-			+/+	+/+	+/+	+/+
	kasuarynina		+/-	+/-			+/+	+/+	+/+	+/+
	stenofylynina A		+/-	+/-			+/+	+/-	+/+	+/+
	stenofylanina A		+/-	+/-			+/+		+/+	+/+
	salikarynina A				+/-		+/-	+/-	+/+	+/+
	gemina A		+/-	+/+			+/+		+/+	+/+
	agrymonina			+/+			+/+		+/+	+/+
oenoteina B										
D2	EA	+/-	+/-	+/+					+/+	
	GHG			+/+					+/+	
	pedunkulagina			+/+					+/+	
	potentylina			+/+					+/+	
	kasuaryktyna			+/+					+/+	
	koriaryna B			+/+					+/+	
	weskalagina	+/-		+/+					+/+	
	kastalagina	+/-		+/+					+/+	
	stachyryna	+/-		+/+					+/+	
	kasuarynina	+/-		+/+					+/+	
	stenofylynina A			+/+					+/+	
	stenofylanina A			+/+					+/+	
	salikarynina A			+/+					+/+	
	gemina A		+/-	+/+					+/+	
	agrymonina		+/-	+/+					+/+	
oenoteina B										
D3	EA	+/-	+/-	+/+	+/+	-/+		+/+	+/+	-/+
	GHG	+/-			+/+	+/+		+/+	-/+	-/+
	pedunkulagina	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+		+/+		
	potentylina	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+		+/+		-/+
	kasuaryktyna	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+		+/+		-/+
	koriaryna B		+/-	+/-	+/+	+/+		+/+	-/+	-/+
	weskalagina	+/-	+/-		-/+	-/+		-/+		
	kastalagina	+/-	+/-		-/+	-/+		+/+		
	stachyryna	+/-	+/-	+/-	+/+	-/+		+/+		-/+
	kasuarynina	+/-	+/-	+/-	+/+	-/+		+/+		
	stenofylynina A	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+		+/+	-/+	-/+
	stenofylanina A	+/-	+/-		-/+	-/+		-/+		
	salikarynina A	+/+			-/+					
	gemina A	+/-	+/-	+/-	+/+	-/+		+/+	-/+	-/+
	agrymonina	+/-	+/-	+/-	+/+	-/+		+/+	-/+	-/+
oenoteina B										

Tabela 1.

Obecność poszczególnych metabolitów po 24/48h inkubacji wybranych elagotanoidów w kulturach *ex vivo* mikroflory jelitowej człowieka pobranej od dawców D1-D3. Pogrubioną czcionką zostały zaznaczone dominujące metabolity.

Mikrobiota jelitowa każdego z ochotników metabolizowała badane elagotanoidy do urolityn w różnym zakresie oraz cechowała się charakterystyczną kompozycją produkowanych metabolitów. Na podstawie produkowanych metabolitów zaliczyłem dawców D1 i D3 do metabotypru B, natomiast dawcę D2 do metabotypru A według klasyfikacji zaproponowanej przez Tomas-Barberan i wsp.¹² Głównym metabolitem produkowanym przez mikrobiotę dawcy D1 była UA. Po 24 h inkubacji obecne w hodowlach były również M6, UC, M7, iUA oraz UB. Po 48h z powodu postępującej dehydroksylacji, M6 i UC nie były już wykrywane, natomiast znacząco wzrosła zawartość UB. Dominującymi metabolitami produkowanymi przez mikrobiotę jelitową dawcy D2 były UC i UA. Nie obserwowałem natomiast powstawania UB. Co ciekawe, mikrobiota pobrana od tego dawcy wykazywała znacznie słabszą zdolność do metabolizowania C-glukozydowych elagotanoidów. Mikrobiota dawcy D3 jako główny związek produkowała iUA. Dodatkowo stwierdziłem obecność dwóch metabolitów, trihydroksylovanego i tetrahydroksylovanego, dla których na podstawie widm UV i MS mogłem postulować, że nie zostały dotychczas opisane w dostępnej literaturze. Jedynym elagotanoidem, który nie ulegał metabolizmowi pod wpływem mikrobioty jelitowej była oenoteina B. Najprawdopodobniej ze względu na fakt, że jest to makrocykliczny elagotanoid, który posiada w swojej strukturze jedynie grupy galoilowe oraz waloneikowe, natomiast nie posiada grupy heksahydroksydifenowej jak pozostałe badane związki.

Przeprowadzone kompleksowe badania metabolizmu elagotanoidów *ex vivo* przez kultury mikrobioty jelitowej człowieka, po raz pierwszy bezpośrednio potwierdziły transformację poszczególnych izolowanych związków do urolityn. Oznacza to, że doustne przyjmowanie produktów pochodzenia roślinnego zawierających badane elagotanoidy może prowadzić do pojawienia się w jelicie grubym biodostępnych urolityn. Charakterystyczny dla poszczególnych związków poziom produkcji urolityn, niezależny od ilości grup heksahydroksydifenowych (HHDP) wskazuje, że związki te nie tylko są substratem do produkcji urolityn, ale również zależnie od struktury i typu mikrobioty, z którym wchodzi w interakcję, mogą oddziaływać na wzrost i/lub aktywność organizmów odpowiedzialnych za metabolizm garbników. Procesy te z pewnością są o wiele bardziej złożone i trudne do przewidzenia w przypadku mieszanin elagotanoidów występujących w roślinach, jednak jeśli w ich składzie występują elagotanoidy, powstawanie urolityn po ich

spożyciu może być postulowane, a ze względu na liczne badania dotyczące aktywności biologicznej urolityn, ich wyniki powinny być brane pod uwagę.

Weryfikacja hipotezy H3

Izolacja urolityn z kultur *ex vivo* mikrobioty jelitowej człowieka. [P3]

Badania aktywności biologicznych urolityn wymagają uzyskania tych związków w stanie czystym. Opracowanie prostych i niedrogich metod otrzymywania urolityn jest szczególnie ważne ze względu na wysoką cenę tych związków oraz brak dostępności na rynku wszystkich pochodnych. Choć prawda chemiczna synteza urolityn została opracowana¹³, jednak ze względu na wykorzystywanie w niej chemicznych katalizatorów takich jak sole miedzi, istnieje ryzyko obecności ich śladowych ilości w końcowym produkcie, co może potencjalnie wpływać na wyniki przeprowadzanych testów aktywności biologicznej.¹⁴

Celem badań było opracowanie alternatywnej metody otrzymywania urolityn z użyciem kultur *ex vivo* mikrobioty jelitowej człowieka.

Wykazałem w poprzednich badaniach [O5], że źródłem elagotanoidów, które pod wpływem mikrobioty jelitowej człowieka przekształcane są do urolityn jest wyciąg wodny z ziela krwawnicy pospolitej (*Lythrum salicaria* L.). Przygotowałem hodowle *ex vivo* mikrobioty jelitowej, które inkubowałem w warunkach beztlenowych z wyciągiem przez 24 i 48 h. Opracowałem prostą metodę otrzymywania urolityn w stanie czystym z użyciem dwuetapowego procesu oczyszczania kultur mikrobioty jelitowej. Polegała ona na ekstrakcji ciecz-ciecz z użyciem eteru dietylowego, a następnie izolacji poszczególnych urolityn z frakcji eterowej z wykorzystaniem wysokosprawnej preparatywnej chromatografii cieczowej. W sumie z 1600 mg wyciągu inkubowanego w hodowli mikrobioty dawcy produkującego izourolitynę A (D3) otrzymałem 7,0 mg izourolityny A oraz 12,5 mg urolityny B.

Jest to pierwsza metoda otrzymywania urolityn z użyciem kultur mikrobioty jelitowej człowieka oraz pierwsza metoda otrzymywania izourolityny A będąca alternatywą do opracowanej wcześniej syntezy.¹⁵ Jest to szczególnie ważne, gdyż związek ten nie jest dostępny na rynku, a ponieważ jego produkcja obserwowana jest u znacznej części populacji (10-50%)¹², jest on niezbędny do prowadzenia badań *in vitro* mających na celu ocenę aktywności biologicznych urolityn. Dodatkowo po raz pierwszy zostały w pełni przypisane sygnały w widmie ¹H i ¹³C NMR dla izourolityny A, co będzie w przyszłości ułatwiać potwierdzanie struktury tego związku.

Opracowana metoda pozwala na dodatkowe zwiększenie skali produkcji oraz umożliwić uzyskanie związków o pożądanym stopniu hydroksylacji poprzez manipulowanie czasem inkubacji. Otrzymywane ilości związków są wystarczające, by mogły zostać wykorzystane do prowadzenia badań *in vitro* oceny aktywności biologicznych urolityn.

Weryfikacja hipotezy H4

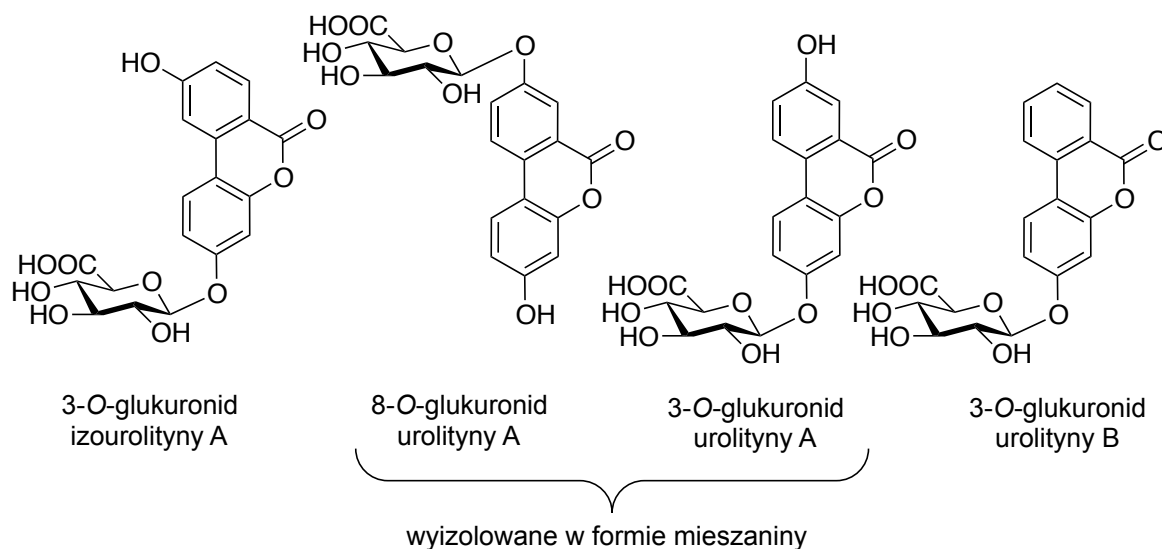
Izolacja metabolitów II fazy urolityn z moczu ochotnika spożywającego produkty bogate w elagotanoidy. [P4]

Po wchłonięciu w jelicie grubym urolityny bardzo szybko ulegają metabolizmowi z udziałem enzymów II fazy, co sprawia, że obecne są w osoczu, tkankach oraz moczu głównie w formie sprzężonej z kwasem glukuronowym, rzadziej w formie siarczanów. Po spożyciu bogatych w elagotanoidy produktów, tylko śladowe ilości wolnych aglikonów urolityn były wykrywane w płynach ustrojowych, co jest prawdopodobnie spowodowane faktem, że do sprzężenia dochodzi już na poziomie nabłonka jelitowego.⁵ Zatem dla pełnej oceny aktywności biologicznej urolityn niezbędne jest prowadzenie badań *in vitro* nie tylko dla aglikonów, ale też dla ich metabolitów II fazy - szczególnie glukuronidów. Dysponowanie wzorcami metabolitów urolityn jest też ważne z punktu widzenia prowadzenia badań *in vivo* połączonych z analizami ilościowymi metabolitów w płynach ustrojowych i tkankach. Metabolity II fazy urolityn nie są dostępne na rynku, opracowane zostały jedynie metody syntezy glukuronidów urolityny A oraz urolityny B.^{16, 17}

Na podstawie wyników badań dotyczących metabolizmu elagotanoidów przez mikrobiotę jelitową pobraną od różnych dawców [P3]¹⁸, wytypowałem dawkę D3, jako posiadającą mikrobiotę produkującą najbardziej zróżnicowaną kompozycję metabolitów. Badając próbki moczu tego ochotnika po spożyciu bogatych w elagotanoidy produktów spożywczych stwierdziłem obecność znacznych ilości metabolitów II fazy urolityn, co doprowadziło mnie do podjęcia próby izolacji tych związków z użyciem metod chromatograficznych.

Zdrowy ochotnik- 30 letni mężczyzna został poproszony o włączenie do swojej diety produktów spożywczych zawierających elagotanoidy: sok z owoców granatu (0,5 l/dzień), orzechy włoskie (30 g/dzień), orzechy laskowe (30 g/dzień) oraz świeże maliny (200 g/dzień). Suplementacja diety trwała 5 dni, podczas których prowadzona była dobowy zbiórka moczu. Mocz w ilości 5,5 l przechowywany był w -20°C.

Następnie zebrany mocz zagęściłem na wyparce w 40 °C i wyekstrahowałem octanem etylu w celu oddzielenia aglikonów oraz lipofilnych składników. Pozostałość wodną poddałem chromatografii kolumnowej z użyciem następujących złóż: Diaion HP-20, żel krzemionkowy oraz Sephadex LH-20. Następnie poszczególne związki wyizolowałem z użyciem wysokosprawnej preparatywnej chromatografii cieczowej. W rezultacie prowadzonych prac izolacyjnych otrzymałem następujące ilości poszczególnych metabolitów: 20 mg glukuronidu izourolityny A, 125 mg glukuronidu urolityny A, 139 mg glukuronidu urolityny B. Po raz pierwszy wyizolowałem glukuronidy urolityn z ludzkiego moczu, co umożliwiło bezpośrednie określenie ich struktur z użyciem metod NMR (**Rycina 3**). Analiza dwuwymiarowych widm NMR pozwoliła na pełne przypisanie sygnałów ^1H i ^{13}C , co nie zostało dotychczas wykonane. Ze względu na symetryczną budowę nie było możliwe rozdzielenie dwóch izomerów glukuronidu urolityny A, jednak określenie ich struktury zostało dokonane ze względu na wyraźną obecność dwóch oddzielnych serii sygnałów w widmach NMR. Po raz pierwszy otrzymałem glukuronid izourolityny A, który obok glukuronidów urolityny A i B jest niezbędny do prowadzenia badań *in vitro* aktywności biologicznych tej grupy metabolitów mikrobioty jelitowej człowieka. Otrzymane ilości glukuronidów urolityn są wystarczające dla zaplanowanych na przyszłość badań ich aktywności biologicznych *in vitro*.



Rycina 3. Struktury wyizolowanych z moczu ochotnika metabolitów urolityn.

Weryfikacja hipotezy H5

Potencjalna znaczenie β -glukuronidaz dla losów urolityn w ustroju człowieka.

[P4]

Badania kliniczne oraz badania na zwierzętach jasno wskazują na prozdrowotne właściwości produktów pochodzenia naturalnego zawierających elagotanoidy. Szczególnie podkreślane są korzystne efekty w schorzeniach związanych ze stanem zapalnym i procesem nowotworzenia. Ze względu na wykazany metabolizm elagotanoidów pod wpływem mikrobioty jelitowej, aktywność biologiczna *in vivo* przyjmowanych doustnie produktów zawierających elagotanoidy przypisywana jest powstającym w jelicie grubym ich biodostępnym metabolitom-urolitynom^{4-6, 19}. Mechanizmy działania urolityn odpowiedzialne za powyższe efekty są przedmiotem wielu badań *in vitro*, których wyniki jednoznacznie wskazują na silne właściwości przeciwzapalne i antyproliferacyjne tych związków.²⁰⁻²³

Badania dotyczące farmakokinetyki urolityn konsekwentnie pokazują, że po wchłonięciu w jelicie grubym związki te ulegają intensywnemu metabolizmowi pod wpływem enzymów II fazy (sprzęganiu z kwasem glukuronowym i siarkowym). W rezultacie w krwioobiegu i w tkankach urolityny obecne są w znacznie większym stężeniu w postaci sprzężonej (głównie z kwasem glukuronowym) niż w postaci wolnej⁵. Obserwacje te powodują, że odnoszenie wyników licznych badań *in vitro* przeprowadzonych dla aglikonów urolityn do efektów obserwowanych *in vivo* staje się problematyczne.

Niewiele jest badań aktywności biologicznej glukuronidów i siarczanów urolityn, co więcej, dotychczasowe porównania aktywności biologicznej form sprzężonych z wolnymi aglikonami wskazują na znaczne osłabienie lub zanik aktywności.^{4, 22, 24-26} Wiadomo ponadto, że sprzęganie jest podstawowym procesem metabolicznym związanym z detoksyfikacją i eliminacją egzogennych substancji znajdujących się w lekach, żywności i zanieczyszczeniach środowiska prowadzącym w większości przypadków do utraty aktywności farmakologicznej.²⁷

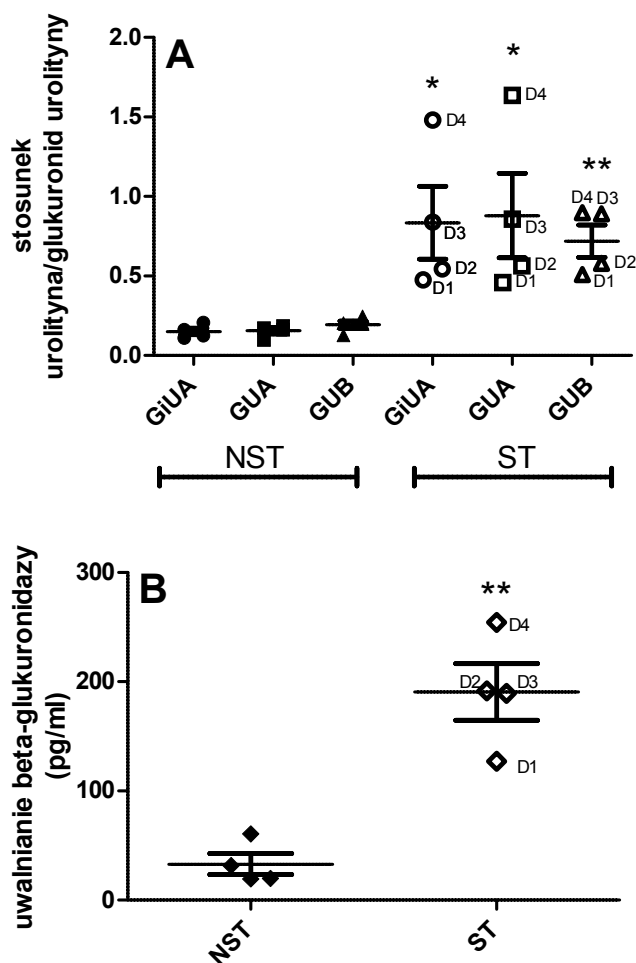
Wiele procesów patologicznych w tym stan zapalny i nowotworzenie są związane ze zwiększonym stężeniem β -glukuronidaz w przestrzeni międzykomórkowej. Ludzka β -glukuronidaza jest enzymem lizosomalnym, którego znacznie podwyższone stężenie obserwowane jest w tkankach objętych stanem zapalnym i procesem nowotworzenia.²⁸ Jest ona wydzielana zarówno przez infiltrujące komórki układu odpornościowego - neutrofile i makrofagi jak i uwalniana z

cytoplazmy uszkodzonych komórek. W rejonach objętych stanem zapalnym i nowotworzeniem dochodzi do upośledzenia czynności mitochondrialnego łańcucha oddechowego, co prowadzi do przejścia mitochondriów na glikolizę tlenową co znane jest jako efekt Warburga. Końcowym produktem glikolizy tlenowej jest kwas mlekowy, którego zwiększone stężenie powoduje obniżenie pH stwarzając optymalne warunki dla enzymatycznej aktywności β -glukuronidazy.^{29, 30} W rezultacie dochodzi do upośledzenia autofagii nieprawidłowo funkcjonujących mitochondriów, co w konsekwencji powoduje aktywację β -glukuronidazy.³¹ Dodatkowo uszkodzone mitochondria, uwalniają formylowane peptydy, które ze względu na podobieństwo do peptydów bakteryjnych powodują aktywację komórek układu odpornościowego poprzez oddziaływanie z receptorem FPR1.³²

β -glukuronidaza jest również czynnikiem wirulencji oraz charakterystycznym enzymem wytwarzanym przez bakterie *Echerichia coli*, które są patogenami najczęściej wywołującymi infekcje układu moczowego.³³⁻³⁵

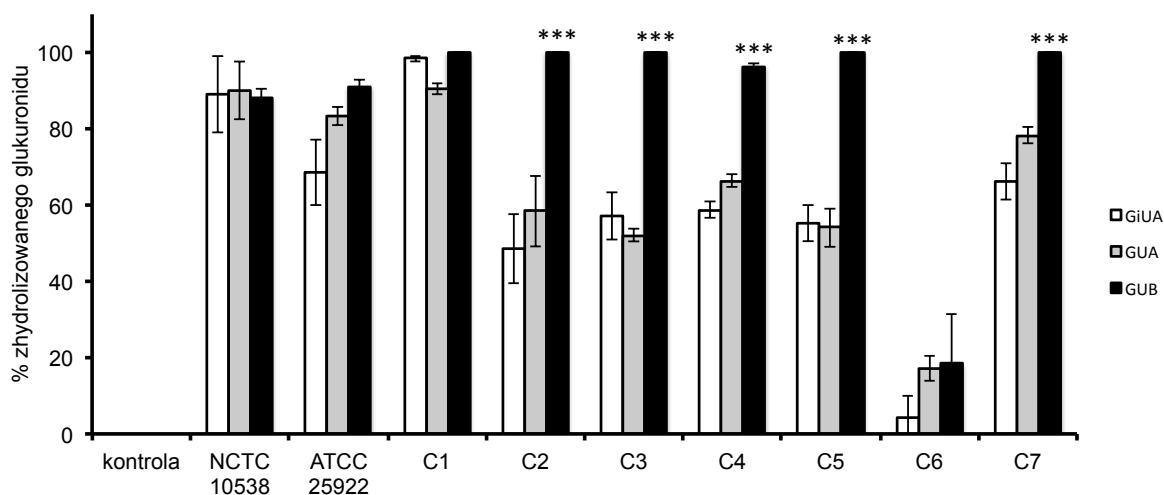
Biorąc pod uwagę wysoką aktywność β -glukuronidaz w tkankach objętych stanem zapalnym i nowotworzeniem, a także w infekcjach dróg moczowych wywołanych bakteriami *E. coli*, celem prac było zbadanie czy glukuronidy urolityn mogą ulegać pod ich wpływem hydrolizie do wykazujących aktywność biologiczną aglikonów.

Wyizolowane z obwodowej krwi ludzkiej neutrofile poddałem stymulacji z użyciem f-MLP i cytochalazyny B w celu wywołania wydzielania ziarnistości azurofilnych zawierających β -glukuronidazę. Następnie pobrałem supernatant, który zakwaśiłem kwasem mlekowym do optymalnego dla aktywności enzymatycznej pH = 5,2. Poziom deglukuronidacji oceniałem przy użyciu metody UHPLC-DAD-MS/MS. Inkubacja glukuronidów urolityny A, izourolityny A oraz urolityny B z supernatantami pobranymi z hodowli neutrofile powodowała ich hydrolizę do aglikonów (**Rycina 4A**). W celu sprawdzenia, czy rzeczywiście β -glukuronidaza była odpowiedzialna za tę reakcję oznaczyłem stężenie enzymu z użyciem testu ELISA, co pozwoliło mi wykazać, że poziom deglukuronidacji korelował z ilościami wydzielonego enzymu przez stymulowane i niestymulowane neutrofile wyizolowane od poszczególnych dawców (**Rycina 4B**).



Rycina 4 (A) Hydroliza glukuronidu izourolityny A (GiUA), glukuronidu urolityny A (GUA) oraz glukuronidu urolityny B (GUB) pod wpływem β -glukuronidazy uwolnionej przez neutrofile stymulowane cytochalazyną B i f-MLP. Neutrofile zostały wyizolowane z obwodowej krwi żyłnej pobranej od 4 różnych dawców (D1-D4). ST- stymulowane neutrofile, NST- niestymulowane neutrofile. (B) poziom uwolnionej β -glukuronidazy oznaczony za pomocą testu ELISA. Znamienność statystyczna: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ wobec odpowiedniej kontroli niestymulowanej.

Glukuronidy urolityn ulegały również hydrolizie w hodowlach *Escherichia coli*. Zarówno szczepy referencyjne jak i kliniczne izolaty pobrane od pacjentów z zakażeniami dróg moczowych były zdolne do hydrolizy badanych związków (**Rycina 5**). Jeden szczep kliniczny (C6) hydrolizował glukuronidy urolityn w znacząco mniejszym stopniu, jednak okazał się być również nieaktywny wobec standardowego testu na aktywność glukuronidazy z użyciem podłoża hodowlanego Fluorocult VRB zawierającego jako substrat 4β -D-glukuronid metyloumbelliferylu.



Rycina 5. Hydroliza glukuronidu izourolityny A (GiUA), glukuronidu urolityny A (GUA) oraz glukuronidu urolityny B (GUB) pod wpływem β -glukuronidazy wytwarzanej przez referencyjne szczepy *E. coli* oraz kliniczne izolaty (C1-C7). . Znamienność statystyczna: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ wobec pozostałych glukuronidów w obrębie jednego badanego szczepu.

Uzyskane wyniki pozwalają postulować, że dominujące w krwioobieg, tkankach oraz w moczu glukuronidy urolityn mogą uwalniać pod wpływem β -glukuronidazy aktywne biologicznie aglikony bezpośrednio w miejscu objętym stanem zapalnym i nowotworzeniem. Uwalnianie aglikonów jest również możliwe w drogach moczowych zainfekowanych wytwarzającymi β -glukuronidazę bakteriami *Escherichia coli*. Biorąc pod uwagę wysoką aktywność przeciwzapalną i antyproliferacyjną wykazaną dla aglikonów urolityn, ich detoksyfikacja poprzez intensywny metabolizm II fazy wydaje się być pożądanym procesem, który zapobiega wpływowi tych związków na cały organizm. Jest to szczególnie istotne, jeśli weźmiemy pod uwagę fakt, że urolityny są produkowane z elagotanoidów, które występują w produktach spożywczych będących składnikami normalnej diety. Można zatem przypuszczać, że selektywna aktywacja glukuronidów urolityn wywoływana przez β -glukuronidazę w obrębie tkanek objętych stanem zapalnym lub procesem nowotworzenia zapobiega ingerencji urolityn w procesy toczące się w zdrowych komórkach.

Weryfikacja hipotezy H6

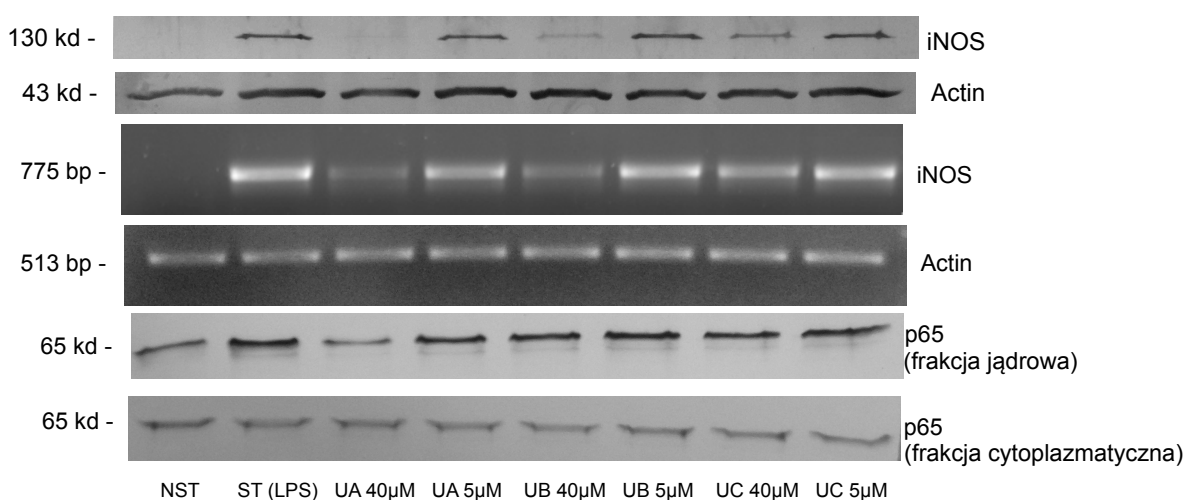
Ocena wpływu urolityn na molekularne mechanizmy odpowiedzi zapalnej makrofagów linii RAW 264.7. [P5]

Wyniki badań *in vivo* prowadzonych na zwierzętach wskazują na szczególną skuteczność podawanych doustnie produktów pochodzenia naturalnego bogatych w elagotanoidy w stanach zapalnych jelit o różnej etiologii.^{19, 36-39} Badanie kliniczne prowadzone dla wyciągu z kłącza pięciornika kurze ziele (*Potentilla erecta* L.) podawanego pacjentom chorym na wrzodziejące stany zapalne jelita grubego wskazało na wyraźny efekt łagodzący przebieg tej choroby.⁴⁰ Z uwagi na wykazany metabolizm elagotanoidów przez mikrobiotę jelitową można przypuszczać, że za obserwowane efekty przeciwzapalne odpowiedzialne są powstające w jelicie grubym urolityny.

Ponieważ istotną rolę w progresji stanów zapalnych, w tym w nieswoistych stanach zapalnych jelit odgrywają makrofagi, celem badań było sprawdzenie, czy powstające w jelicie grubym biodostępne metabolity elagotanoidów - urolityny mogą wpływać na szlaki sygnalizacyjne w komórkach makrofagów linii RAW 264.7 związane z ich odpowiedzią prozapalną.

Do badań wybrałem trzy najbardziej rozpowszechnione metabolity elagotanoidów: urolitynę A (UA), urolitynę B (UB) oraz urolitynę C (UC). Inkubacja makrofagów linii RAW 264.7 z lipopolisacharydem (LPS) powodowała znaczne zwiększenie wydzielania tlenku azotu (NO) do medium hodowlanego, natomiast inkubacja komórek z poszczególnymi urolitynami powodowała zahamowanie wydzielania NO. Najsilniejszą inhibicję wykazywała UA, która zależnie od stężenia była aktywna w zakresie 2,5-40 μM i $\text{IC}_{50} = 9,8 \mu\text{M}$. Pozostałe dwa związki działały znacznie słabiej, UB była aktywna tylko w stężeniach 20 i 40 μM , natomiast najslabiej działająca UC tylko w stężeniu 40 μM . Ponieważ wiadomo, że za produkcję NO wywołaną LPS odpowiedzialna jest indukowana syntaza tlenku azotu (iNOS) sprawdziłem wpływ urolityn na produkcję iNOS oraz na ekspresję mRNA dla iNOS. Poziom iNOS oznaczony metodą Western blot wykazał, że obserwowany spadek wydzielania NO był zależny od zmniejszonej produkcji tego enzymu w makrofagach, a badania z użyciem metody RT-PCR potwierdziły, że powodem było obniżenie ekspresji mRNA dla iNOS. Poziom inhibicji ekspresji i produkcji iNOS oznaczony dla poszczególnych urolityn korelował z obserwowanym wcześniej poziomem zahamowania wydzielania NO (UA>UB>UC). Ponieważ ekspresja iNOS jest

regulowana przez czynnik transkrypcyjny NF- κ B, zbadałem wpływ urolityn na translokację podjednostki p65 NF- κ B do jądra komórkowego. Inkubacja makrofagów z urolitynami powodowała zahamowanie wywołanej LPS translokacji p65 do jądra komórkowego. Najaktywniejszym związkiem ponownie okazała się być UA, która działała zarówno w stężeniu 40 jak i 5 μ M (**Rycina 6**). Co więcej, UA i UB w stężeniu 40 μ M hamowały wiązanie się podjednostki p50 z DNA. Badane urolityny nie tylko hamowały ekspresję mRNA dla iNOS, lecz również były aktywne wobec wywołanej LPS zwiększonej ekspresji mRNA dla podstawowych cytokin prozapalnych produkowanych przez makrofagi: TNF- α , IL-1 β , IL-6.



Rycina 6. Wpływ badanych urolityn na indukowaną LPS produkcję iNOS, ekspresję mRNA dla iNOS oraz translokacją do jądra komórkowego podjednostki p65 NF- κ B w makrofagach linii RAW 264.7.

Po raz pierwszy opisałem dla urolityn mechanizm aktywności hamującej odpowiedź zapalną w komórkach makrofagów wywołaną stymulacją receptora TLR4. Obserwowany hamujący wpływ na ekspresję mRNA dla iNOS oraz cytokin prozapalnych w komórkach makrofagów linii RAW 264.7 zależny od zahamowania szlaku sygnalizacyjnego NF- κ B wskazuje na potencjalny mechanizm działania urolityn. Otrzymane rezultaty przyczyniają się do potwierdzenia skuteczności bogatych w elagotanoidy produktów pochodzenia naturalnego w prewencji i terapii stanów zapalnych o różnej etiologii, w szczególności nieswoistych stanów zapalnych jelit, oraz wskazują molekularne mechanizmy odpowiedzialne za obserwowane efekty. Otrzymane rezultaty dodatkowo podkreślają potrzebę brania pod uwagę aktywności metabolicznej mikrobioty jelitowej przy ustalaniu mechanizmu działania i ocenie wpływu na organizm żywności oraz leków

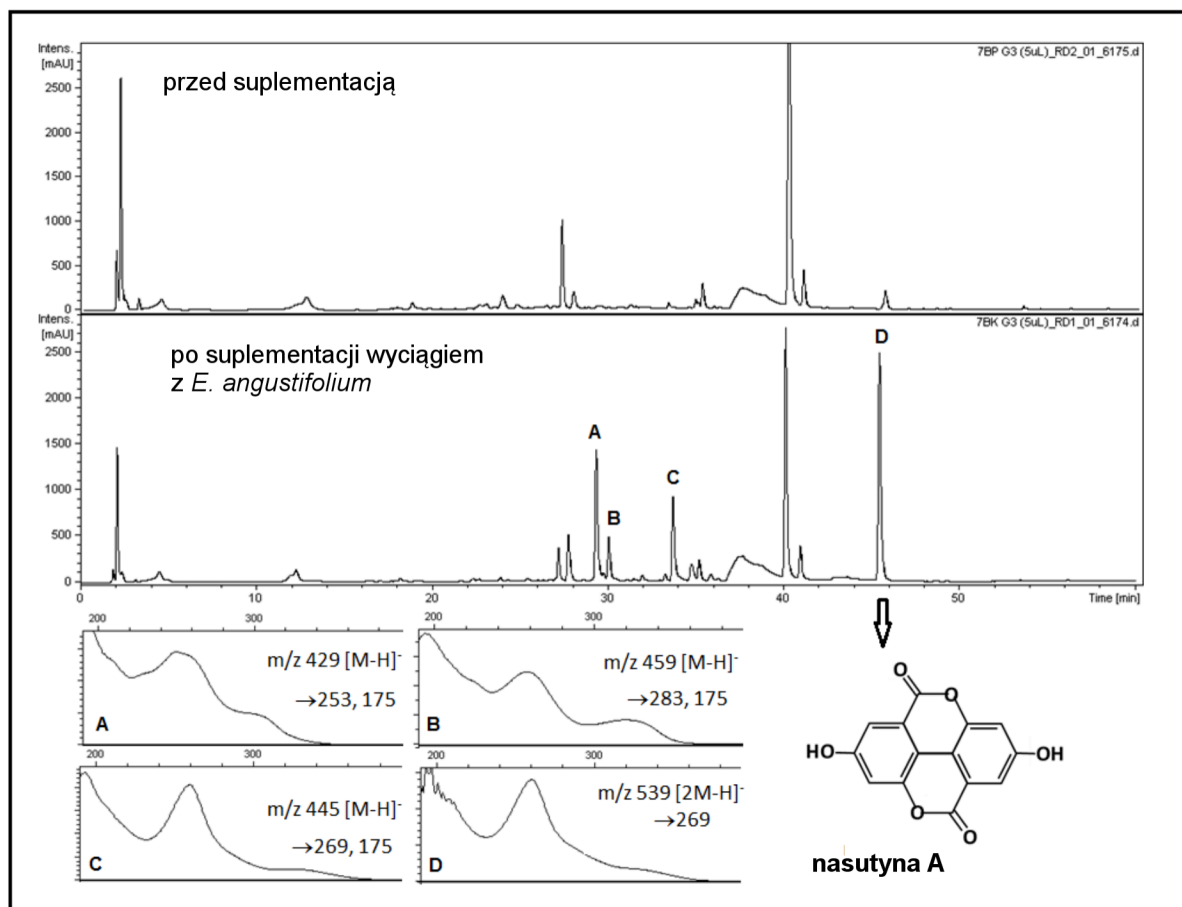
Weryfikacja hipotezy H7

Poszukiwanie związków i metabolitów odpowiedzialnych za antyproliferacyjne właściwości wyciągu z *Epilobium angustifolium*.

Napary przygotowywane z części nadziemnych gatunków należących do rodzaju wierzbówka (*Epilobium* sp.) są tradycyjnie stosowane w leczeniu wczesnych stadiów łagodnego przerostu gruczołu krokowego (BPH) oraz gruczolaka prostaty. Badania *in vitro* prowadzone dla wyciągów z różnych gatunków *Epilobium* potwierdzają przypisywane tradycyjnie właściwości lecznicze i wskazują dominujący makrocykliczny elagotanoid - oenoteinę B jako czynnik warunkujący obserwowane aktywności biologiczne.⁴¹ Z uwagi na nie do końca ustaloną biodostępność oenoteiny B, odnośnienie wyników badań otrzymanych na modelach *in vitro* do efektów obserwowanych *in vivo* napotyka na pewne trudności. Ponieważ oenoteina B należy do grupy elagotanoidów powinna zostać rozważona możliwość jej metabolizmu do urolityn pod wpływem mikrobioty jelitowej. Badania przeprowadzone dla wyciągów wodnych z ziela *Epilobium hirsutum* potwierdziły, że występujące w nim elagotanoidy są metabolizowane do urolityn⁴², jednak późniejsze badania [P3] jasno wykazały, że w przeciwieństwie do innych badanych elagotanoidów izolowana oenoteina B nie jest metabolizowana do urolityn w kulturach *ex vivo* mikrobioty jelitowej człowieka .

Celem badań było podjęcie próby wskazania, jakie związki pojawiają się w organizmie szczurów po doustnym podaniu wyciągu wodnego z *Epilobium angustifolium* i tym samym mogą warunkować obserwowane *in vivo* zahamowanie wzrostu implantowanych dootrzewnowo komórek LNCaP.

Podawany szczurom w dawkach 50, 100 i 200 mg/kg/m.c/dzień wyciąg z *E. angustifolium* zawierający 15% oenoteiny B powodował znaczny spadek częstości rozwoju gruczolaka u badanych zwierząt (do 25% w porównaniu z 71% dla grupy kontrolnej). W celu wskazania potencjalnych czynników odpowiedzialnych za obserwowaną aktywność *in vivo* zbadalem kał i mocz zwierząt metodą UHPLC-DAD-MS/MS. W badanych próbkach od zwierząt, którym podawano ekstrakt nie stwierdziłem obecności ani oenoteiny B ani metabolitów elagotanoidów produkowanych pod wpływem mikrobioty jelitowej - urolityn. Porównując profile chromatograficzne moczu stwierdziłem obecność czterech metabolitów, które pojawiły się po spożyciu badanego wyciągu przez zwierzęta: **A** o m/z 429 [M-H]⁻, **B** o m/z 459 [M-H]⁻, **C** o m/z 445 [M-H]⁻ oraz **D** o m/z 269 [M-H]⁻ (**Rycina 7**).



Rycina 7. Metabolity wykryte w moczu szczurów po doustnym podawaniu wyciągu z *E. angustifolium* w dawce 200 mg/kg m.c.

Fragmentacja poszczególnych jonów (oprócz związku **D**) pokazała, że związki te ze względu na charakterystyczne ubytki masy 176 amu, są najprawdopodobniej glukuronidami. Bazując na widmach UV oraz danych MS metabolit **D** został zidentyfikowany jako 4,9-dehydroksy-kwas elagowy - czyli nasutyna A (**NAS**), metabolit **A** jako glukuronid dehydroksynasutyny A, metabolit **B** jako glukuronid metylonasutyny A, a metabolit **C** jako glukuronid nasutyny A.^{43, 44} Obecność nasutyn i ich metabolitów została dotychczas stwierdzona jedynie u bobrów, świń oraz szczurów karmionych pożywieniem zawierającym elagotanoidy. Jak dotąd nie stwierdzono obecności tych związków u ludzi.^{44, 45} Dlatego kolejnym krokiem było zbadanie metabolitów występujących w ludzkim moczu po spożyciu przez ochotników naparu z ziela *E. angustifolium*. Suplementacja diety naparem z *E. angustifolium* powodowała pojawienie się w moczu ochotników jedynie metabolitów urolityn; u ochotnika V1 dominowały glukuronid urolityny A i glukuronid urolityny B,

podczas gdy u ochotnika V2 występował również glukuronid izourolityny A. Nie stwierdziłem obecności nasutyn ani ich metabolitów sprzężonych z kwasem glukuronowym. Podobnie jak w badaniach na zwierzętach nie stwierdziłem też obecności oenoteiny B. Inkubacja *ex vivo* mikrobioty jelitowej pobranej od ochotnika V2 z wyciągiem z *E. angustifolium* prowadziła do powstania odpowiednich aglikonów urolityn (iUA, UA i UB). Gdy wyciąg został rozfrakcjonowany z użyciem octanu etylu, kwas elagowy i elagotanoidy obecne we frakcji octanowej były metabolizowane do urolityn, natomiast jedynie śladowe ilości urolityn były produkowane z pozostałości wodnej, w której dominującym związkiem była oenoteina B. Inkubacja *ex vivo* izolowanej oenoteiny B z mikrobiotą jelitową również nie powodowała powstawania urolityn, których produkcja była obserwowana dla użytej jako kontrola pozytywna weskalaginy. Dla powstałych metabolitów została wykazana aktywność antyproliferacyjna *in vitro* wobec komórek LNCaP, która jest spójna z wynikami uprzednio przeprowadzanych badań.^{46, 47} Z uwagi na fakt, że dominująca w wyciągu z *E. angustifolium* oenoteina B nie ulega metabolizmowi przez organizmy wchodzące w skład mikrobioty odpowiedzialne za produkcję urolityn i nasutyn, powstające z pozostałych elagotanoidów i kwasu elagowego metabolity wydają się być jedynie częściowo odpowiedzialne za obserwowane efekty *in vivo*. Dalsze badania dotyczące oenoteiny B są niezbędne aby określić czy ten aktywny *in vitro* związek jest wchłaniany w niezmienionej formie czy też transformowany do nieznanych dotychczas i nie wykrytych podczas obecnie prowadzonych badań metabolitów. Należy wziąć również pod uwagę możliwość wpływu wyciągu z *E. angustifolium* i dominującej oenoteiny B na układ immunologiczny poprzez modulację składu mikrobioty jelitowej i jej oddziaływania na organizm gospodarza. Szczególnie, że właściwości immunostymulujące oenoteiny B były opisywane w literaturze.⁴⁸

Przeprowadzone badania nie pozwoliły w pełni wykazać roli oenoteiny B w aktywności *in vivo* wyciągu z *E. angustifolium*. Pomimo wykazanych wyraźnych efektów *in vivo* nie udało się jednoznacznie wskazać czynników, które mogą być odpowiedzialne za obserwowane zahamowanie proliferacji komórek nowotworu prostaty. Międzygatunkowe różnice w metabolizmie mikrobioty jelitowej elagotanoidów występujących w *E. angustifolium*, wykazane poprzez stwierdzenie obecności różnych metabolitów w moczu - nasutyn u szczurów i urolityn na modelu ludzkim, wymaga ostrożnego podejścia przy interpretacji wyników badań aktywności

biologicznych wykazanych na modelu zwierzęcym w kontekście potencjalnych efektów terapeutycznych obserwowanych u ludzi.

Podsumowanie pracy przeglądowej.

Udział elagotanoidów, galotanoidów i ich metabolitów w aktywności przeciwzapalnej produktów spożywczych i surowców leczniczych pochodzenia roślinnego. [P7]

Popularność produktów spożywczych oraz surowców leczniczych pochodzenia roślinnego bogatych w garbniki hydrolizujące w ostatnich latach zaczęła gwałtownie wzrastać. Pośród różnych właściwości prewencyjnych i terapeutycznych przypisywanych produktom zawierającym galotanoidy i elagotanoidy, te związane z korzystnym wpływem na choroby o podłożu zapalnym są szczególnie często podkreślane. Wyniki badań klinicznych, interwencyjnych oraz *in vivo* na zwierzętach jasno wskazują na przeciwzapalne właściwości zawierających garbniki hydrolizujące produktów, jak i samych galotanoidów i elagotanoidów. Ostatnio znaczny nacisk został położony na uwzględnianie metabolizmu i biodostępności produktów pochodzenia naturalnego przy planowaniu i wykonywaniu badań aktywności biologicznych. Przeprowadzone dla polifenoli badania metabolizmu *in vitro* i *in vivo* każą dopatrywać się kluczowej roli mikrobioty jelitowej w prozdrowotnych efektach związanych z doustnym przyjmowaniem tych związków.

Celem pracy przeglądowej było podsumowanie dotychczasowej wiedzy z zakresu fitochemii zawierających garbniki produktów pochodzenia naturalnego oraz badań dotyczących ich aktywności przeciwzapalnej połączone z dyskusją dotyczącą współczesnego podejścia do ich biodostępności i metabolizmu.

Doustnie przyjmowane produkty pochodzenia naturalnego zawierające garbniki z uwagi na ograniczoną biodostępność galotanoidów i elagotanoidów mogą wpływać na odpowiedź immunologiczną na poziomie układu pokarmowego a także poprzez modulujący wpływ na skład mikrobioty jelitowej. Jednak ze względu na strukturalne zmiany zachodzące podczas tranzytu tych związków przez przewód pokarmowy związane z hydrolizą i metabolizmem prowadzonym przez mikrobiotę jelitową, aktywność powstających metabolitów powinna być brana pod uwagę. Badania dotyczące aktywności biologicznych metabolitów garbników, w szczególności powstających pod wpływem mikrobioty jelitowej urolityn, wskazują na

ich silne i zależne od struktury właściwości przeciwzapalne, które są obserwowane w stężeniach będących w zakresie ich biodostępności.

Wpływ garbników hydrolizujących na procesy zapalne jest dobrze potwierdzony zarówno na modelach *in vitro* jak i *in vivo*, podczas gdy wykazany w ostatnich latach hamujący wpływ na odpowiedź immunologiczną ich metabolitów produkowanych przez mikrobiotę jelitową daje nową perspektywę na rozumienie przypisywanych zawierającym garbniki produktom właściwości przeciwzapalnych, szczególnie podkreślanych w przypadku nieswoistych stanów zapalnych jelit i chorób układu sercowo naczyniowego.

Weryfikacja postawionych hipotez doprowadziła do następujących wniosków podsumowujących przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe:

- Elagotanoidy zależnie od struktury modulują odpowiedź zapalną ludzkich neutrofilii *in vitro*, co może tłumaczyć tradycyjne stosowanie miejscowe produktów pochodzenia naturalnego je zawierających w leczeniu stanów zapalnych skóry i błon śluzowych.
- Elagotanoidy przynależące do różnych grup strukturalnych mogą być bezpośrednio metabolizowane przez mikrobiotę jelitową do biodostępnych metabolitów - urolityn. W zależności od metabolotypu mikrobioty jelitowej powstaje odmienna kompozycja urolityn, a struktura elagotanoidów ma istotne znaczenie dla ilości produkowanych metabolitów.
- Poprzez zwiększenie skali hodowli ludzkiej mikrobioty *ex vivo* i dzięki opracowanej dwuetapowej metodzie izolacji urolityn możliwe jest otrzymanie znacznych ilości związków w stanie czystym, które mogą w przyszłości zostać użyte do badań aktywności biologicznych *in vitro*.
- Przy użyciu metod chromatograficznych zostały wyizolowane z moczu ochotnika spożywającego produkty spożywcze bogate w elagotanoidy, metabolity II fazy urolityn, które mogą zostać użyte do badań biologicznych aktywności *in vitro* oraz jako substancje wzorcowe w badaniach farmakokinetycznych urolityn *in vivo*.
- Potwierdzenie hydrolizy glukuronidów urolityn pod wpływem β -glukuronidazy uwalnianej ze stymulowanych neutrofilii oraz β -glukuronidazy produkowanej

przez bakterie *Escherichia coli* otwiera nowe perspektywy dotyczące losu urolityn w organizmie związane z możliwością ich bezpośredniej aktywacji w miejscu objętym stanem zapalnym, nowotworzeniem czy infekcją.

- Wykazany wpływ urolityn na molekularne mechanizmy warunkujące odpowiedź zapalną makrofagów linii RAW 264.7 przyczynia się do potwierdzenia skuteczności stosowanych doustnie bogatych w elagotanoidy produktów pochodzenia naturalnego w prewencji i terapii stanów zapalnych o różnej etiologii, w szczególności nieswoistych stanów zapalnych jelit.
- Nie udało się w pełni wykazać roli oenoteiny B w aktywności *in vivo* wyciągu z *E. angustifolium*, który podawany szczurom z implantowanymi dootrzewnowo komórkami LNCaP powodował zahamowanie rozwoju gruczolaka. Nie było również możliwe jednoznaczne wskazanie metabolitów, które mogą być odpowiedzialne za obserwowaną aktywność.

Piśmiennictwo:

1. Tuohy, K.; Del Rio, D., *Diet-Microbe Interactions in the Gut. Effects on Human Health and Disease*. Elsevier: 2015.
2. Haiser, H. J.; Turnbaugh, P. J., Developing a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Pharmacological Research* 2013, 69, (1), 21-31.
3. Piwowarski, J. P.; Granica, S.; Zwierzyńska, M.; Stefanska, J.; Schopohl, P.; Melzig, M. F.; Kiss, A. K., Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. *Journal of Ethnopharmacology* 2014, 155, (1), 801-809.
4. Espin, J. C.; Larrosa, M.; Garcia-Conesa, M. T.; Tomas-Barberan, F., Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic Acid-derived metabolites: the evidence so far. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 2013, 2013, 270418.
5. Tomas-Barberan, F. A.; Gonzalez-Sarrias, A.; Garcia-Villalba, R.; Nunez-Sanchez, M. A.; Selma, M. V.; Garcia-Conesa, M. T.; Espin, J. C., Urolithins, the rescue of 'old' metabolites to understand a 'new' concept: metabotypes as a nexus between phenolic metabolism, microbiota dysbiosis and host health status. *Molecular Nutrition and Food Research* 2016 DOI: 10.1002/mnfr.201500901

6. Larrosa, M.; Garcia-Conesa, M. T.; Espin, J. C.; Tomas-Barberan, F. A., Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Mol Aspects Med* 2010, 31, (6), 513-539.
7. Colombo, E.; Sangiovanni, E.; Dell'agli, M., A review on the anti-inflammatory activity of pomegranate in the gastrointestinal tract. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 2013, 247145.
8. Piwowarski, J. P.; Kiss, A. K.; Kozłowska-Wojciechowska, M., Anti-hyaluronidase and anti-elastase activity screening of tannin-rich plant materials used in traditional Polish medicine for external treatment of diseases with inflammatory background. *Journal of Ethnopharmacology* 2011, 137, (1), 937-941.
9. Tomczyk, M.; Latte, K. P., Potentilla--a review of its phytochemical and pharmacological profile. *Journal of Ethnopharmacology* 2009, 122, (2), 184-204.
10. Piwowarski, J. P.; Granica, S.; Kiss, A. K., *Lythrum salicaria* L.- Underestimated medicinal plant from European traditional medicine. A review. *Journal of Ethnopharmacology* 2015, 170, 226-50.
11. Menkovic, N.; Savikin, K.; Tasic, S.; Zdunic, G.; Stesevic, D.; Milosavljevic, S.; Vincek, D., Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *Journal of Ethnopharmacology* 2011, 133, (1), 97-107.
12. Tomas-Barberan, F. A.; Garcia-Villalba, R.; Gonzalez-Sarrias, A.; Selma, M. V.; Espin, J. C., Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014, 62, (28), 6535-6538.
13. Bialonska, D.; Kasimsetty, S. G.; Khan, S. I.; Ferreira, D., Urolithins, intestinal microbial metabolites of Pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57, (21), 10181-10186.
14. Tomás-Barberan, F. A.; Garcia-Conesa, M. T.; Larrosa, M.; González-Barrio, R.; Bermúdez-Soto, M. J.; González-Sarrias, A.; Espin, J. C., Bioavailability, metabolism, and bioactivity of food ellagic acid and related polyphenols. In *Recent Advances in Polyphenol Research*, Daayf, F.; Lattanzio, V., Blackwell Publishing Ltd: Chichester, Wielka Brytania, 2008.

15. Pandey, J.; Jha, A. K.; Hajela, K.; Murthy, P. S. N.; Sharma, S.; Keshri, G.; Dwivedi, A.; Singh, M. M., Synthesis and biological activities of some new dibenzopyranones and dibenzopyrans: search for potential estrogen receptor agonists and antagonists (Vol 12, pg 2239, 2004). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2004, 12, (19), 5237-5237.
16. Lucas, R.; Alcantara, D.; Morales, J. C., A concise synthesis of glucuronide metabolites of urolithin-B, resveratrol, and hydroxytyrosol. *Carbohydrate Research* 2009, 344, (11), 1340-1346.
17. Gonzalez-Sarrias, A.; Miguel, V.; Merino, G.; Lucas, R.; Morales, J. C.; Tomas-Barberan, F.; Alvarez, A. I.; Espin, J. C., The gut microbiota ellagic acid-derived metabolite urolithin A and its sulfate conjugate are substrates for the drug efflux transporter breast cancer resistance protein (ABCG2/BCRP). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2013, 61, (18), 4352-4359.
18. Piwowarski, J. P.; Granica, S.; Stefańska, J.; Kiss, A. K., Differences in Metabolism of Ellagitannins by Human Gut Microbiota ex Vivo Cultures. *Journal of Natural Products* 2016, 79, (12), 3022-3030.
19. Larrosa, M.; Gonzalez-Sarrias, A.; Yanez-Gascon, M. J.; Selma, M. V.; Azorin-Ortuno, M.; Toti, S.; Tomas-Barberan, F.; Dolaro, P.; Espin, J. C., Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2010, 21, (8), 717-725.
20. Gonzalez-Sarrias, A.; Espin, J. C.; Tomas-Barberan, F. A.; Garcia-Conesa, M. T., Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins. *Molecular Nutrition and Food Research* 2009, 53, (6), 686-698.
21. Gonzalez-Sarrias, A.; Nunez-Sanchez, M. A.; Tome-Carneiro, J.; Tomas-Barberan, F. A.; Garcia-Conesa, M. T.; Espin, J. C., Comprehensive characterization of the effects of ellagic acid and urolithins on colorectal cancer and key-associated molecular hallmarks: MicroRNA cell specific induction of CDKN1A (p21) as a common mechanism involved. *Molecular Nutrition and Food Research* 2016, 60, (4), 701-716.
22. Piwowarski, J. P.; Granica, S.; Kiss, A. K., Influence of gut microbiota-derived ellagitannins' metabolites urolithins on pro-inflammatory activities of human neutrophils. *Planta Medica* 2014, 80, (11), 887-895.

23. Piwowarski, J. P.; Kiss, A. K.; Granica, S.; Moeslinger, T., Urolithins, gut microbiota-derived metabolites of ellagitannins, inhibit LPS-induced inflammation in RAW 264.7 murine macrophages. *Molecular Nutrition and Food Research* 2015, 59, (11), 2168-2177.
24. Adams, L. S.; Zhang, Y.; Seeram, N. P.; Heber, D.; Chen, S., Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro. *Cancer Prevention Research* 2010, 3, (1), 108-113.
25. Dellafiora, L.; Mena, P.; Cozzini, P.; Brighenti, F.; Del Rio, D., Modelling the possible bioactivity of ellagitannin-derived metabolites. In silico tools to evaluate their potential xenoestrogenic behavior. *Food and Function* 2013, 4, (10), 1442-1451.
26. Gimenez-Bastida, J. A.; Gonzalez-Sarrias, A.; Larrosa, M.; Tomas-Barberan, F.; Espin, J. C.; Garcia-Conesa, M. T., Ellagitannin metabolites, urolithin A glucuronide and its aglycone urolithin A, ameliorate TNF-alpha-induced inflammation and associated molecular markers in human aortic endothelial cells. *Molecular Nutrition and Food Research* 2012, 56, (5), 784-796.
27. Ding, Y.; Peng, M.; Zhang, T.; Tao, J. S.; Cai, Z. Z.; Zhang, Y., Quantification of conjugated metabolites of drugs in biological matrices after the hydrolysis with beta-glucuronidase and sulfatase: a review of bio-analytical methods. *Biomedical Chromatography* 2013, 27, (10), 1280-1295.
28. Tranoy-Opalinski, I.; Legigan, T.; Barat, R.; Clarhaut, J.; Thomas, M.; Renoux, B.; Papot, S., beta-Glucuronidase-responsive prodrugs for selective cancer chemotherapy: an update. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014, 74, 302-313.
29. Warburg, O., On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956, 124, (3215), 269-270.
30. Palsson-McDermott, E. M.; O'Neill, L. A., The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases. *Bioessays* 2013, 35, (11), 965-973.
31. Ishisaka, A.; Kawabata, K.; Miki, S.; Shiba, Y.; Minekawa, S.; Nishikawa, T.; Mukai, R.; Terao, J.; Kawai, Y., Mitochondrial dysfunction leads to deconjugation of quercetin glucuronides in inflammatory macrophages. *PLoS One* 2013, 8, (11), e80843.
32. Sun, N.; Youle, R. J.; Finkel, T., The Mitochondrial Basis of Aging. *Molecular Cell* 2016, 61, (5), 654-666.

33. McLellan, L. K.; Hunstad, D. A., Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends in Molecular Medicine* 2016, 22, (11), 946-957.
34. Helander, A.; Dahl, H., Urinary tract infection: a risk factor for false-negative urinary ethyl glucuronide but not ethyl sulfate in the detection of recent alcohol consumption. *Clinical Chemistry* 2005, 51, (9), 1728-1730.
35. Vinacur, J. C.; Casellas, J. M.; Rubi, R. A.; Oneto, E. P., Serum anti-Escherichia coli antibodies and urinary beta-glucuronidase for the diagnosis and control of evolution of urinary infection during pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1974, 120, (6), 812-816.
36. Wang, L. S.; Kuo, C. T.; Stoner, K.; Yearsley, M.; Oshima, K.; Yu, J.; Huang, T. H.; Rosenberg, D.; Peiffer, D.; Stoner, G.; Huang, Y. W., Dietary black raspberries modulate DNA methylation in dextran sodium sulfate (DSS)-induced ulcerative colitis. *Carcinogenesis* 2013, 34, (12), 2842-2850.
37. Rosillo, M. A.; Sanchez-Hidalgo, M.; Cardeno, A.; Aparicio-Soto, M.; Sanchez-Fidalgo, S.; Villegas, I.; de la Lastra, C. A., Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. *Pharmacological Research* 2012, 66, (3), 235-242.
38. Kanodia, L.; Borgohain, M.; Das, S., Effect of fruit extract of *Fragaria vesca* L. on experimentally induced inflammatory bowel disease in albino rats. *Indian Journal of Pharmacology* 2011, 43, (1), 18-21.
39. Mandalari, G.; Bisignano, C.; Genovese, T.; Mazzon, E.; Wickham, M. S.; Paterniti, I.; Cuzzocrea, S., Natural almond skin reduced oxidative stress and inflammation in an experimental model of inflammatory bowel disease. *International Immunopharmacology* 2011, 11, (8), 915-924.
40. Huber, R.; Ditfurth, A. V.; Amann, F.; Guthlin, C.; Rostock, M.; Trittler, R.; Kummerer, K.; Merfort, I., Tormentil for active ulcerative colitis: an open-label, dose-escalating study. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2007, 41, (9), 834-838.
41. Granica, S.; Piwowarski, J. P.; Czerwinska, M. E.; Kiss, A. K., Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): a review. *Journal of Ethnopharmacology* 2014, 156, 316-346.
42. Stolarczyk, M.; Piwowarski, J. P.; Granica, S.; Stefanska, J.; Naruszewicz, M.; Kiss, A. K., Extracts from *Epilobium* sp. herbs, their components and gut microbiota metabolites of *Epilobium* ellagitannins, urolithins, inhibit hormone-dependent prostate

cancer cells-(LNCaP) proliferation and PSA secretion. *Phytotherapy Research* 2013, 27, (12), 1842-1848.

43. Moore, B. P., The chemistry of the nasutins. *Australian Journal of Chemistry* 1964, 17, 901-907.

44. Gonzalez-Barrio, R.; Truchado, P.; Ito, H.; Espin, J. C.; Tomas-Barberan, F. A., UV and MS identification of urolithins and nasutins, the bioavailable metabolites of ellagitannins and ellagic acid in different mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011, 59, (4), 1152-1162.

45. Kosmala, M.; Zdunczyk, Z.; Juskiewicz, J.; Jurgonski, A.; Karlinska, E.; Macierzynski, J.; Janczak, R.; Roj, E., Chemical composition of defatted strawberry and raspberry seeds and the effect of these dietary ingredients on polyphenol metabolites, intestinal function, and selected serum parameters in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2015, 63, (11), 2989-2996.

46. Seeram, N. P.; Aronson, W. J.; Zhang, Y.; Henning, S. M.; Moro, A.; Lee, R. P.; Sartippour, M.; Harris, D. M.; Rettig, M.; Suchard, M. A.; Pantuck, A. J.; Beldegrun, A.; Heber, D., Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, (19), 7732-7737.

47. Sanchez-Gonzalez, C.; Ciudad, C. J.; Noe, V.; Izquierdo-Pulido, M., Walnut polyphenol metabolites, urolithins A and B, inhibit the expression of the prostate-specific antigen and the androgen receptor in prostate cancer cells. *Food and Function* 2014, 5, (11), 2922-2930.

48. Schepetkin, I. A.; Ramstead, A. G.; Kirpotina, L. N.; Voyich, J. M.; Jutila, M. A.; Quinn, M. T., Therapeutic potential of polyphenols from *Epilobium angustifolium* (Fireweed). *Phytotherapy Research* 2016, 30, (8), 1287-1297.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

a) działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Swoją działalność naukową rozpocząłem na IV roku studiów gdy wstąpiłem do Koła Naukowego w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii WUM, moim opiekunem była dr Anna Kiss. Zajmowałem się badaniami składu wyciągów z różnych gatunków wierzbówek (*Epilobium* sp.). Wyniki prowadzonych badań pozwoliły dokładnie scharakteryzować skład fitochemiczny wyciągów, dla których następnie zostały wykonane badania aktywności biologicznych na różnych modelach komórkowych. Wyniki prowadzonych przeze mnie wtedy badań zostały ujęte w publikacji **O18** i zaprezentowane na konferencji **K27**. W tym samym czasie działałem w Kole Naukowym w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM pod opieką dr Joanny Stefańskiej badając przesiewowo aktywność bakteriostatyczną i fungistatyczną związków otrzymanych na drodze syntezy. Zdobyłem tam cenne umiejętności pracy z materiałem mikrobiologicznym, które okazały się przydatne w mojej przyszłej pracy naukowej.

Dalsze prace badawcze związane były z moją pracą magisterską wykonywaną w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii, której promotorem była dr hab. Małgorzata Kozłowska-Wojciechowska, a opiekunem dr Anna Kiss. Praca dotyczyła roślin leczniczych bogatych w elagotanoidy, które są stosowane w medycynie ludowej w leczeniu schorzeń o podłożu zapalnym (szczególnie w stanach zapalnych skóry i błon śluzowych, chorobach układu krążenia oraz w nieswoistych stanach zapalnych jelit). Wybrałem 12 surowców roślinnych bogatych w elagotanoidy tradycyjnie stosowanych w polskiej medycynie ludowej. Przeprowadziłem dla nich ilościową i jakościową analizę fitochemiczną oraz wykazałem, że mogą swoją skuteczność zawdzięczać hamowaniu rozkładu macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez inhibicję aktywności hialuronidazy i elastazy. Wyniki prowadzonych badań były przedmiotem publikacji **O17**.

Badania prowadzone w ramach pracy magisterskiej doprowadziły do wytypowania najsilniej działającego wyciągu, którym był wyciąg wodny z ziela krwawnicy pospolitej (*Lythrum salicaria* L., Lythraceae). Poszerzone badania fitochemiczne, aktywności biologicznej oraz metabolizmu wyciągu z ziela krwawnicy były tematem prac badawczych prowadzonych w ramach studiów doktoranckich,

które odbywałem w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii i rozprawy doktorskiej, której promotorem była dr hab. Anna Kiss.

Pomimo faktu, że ziele krwawnicy jest farmakopealną substancją roślinną, jego skład był dotychczas słabo poznany, również liczba badań dotyczących aktywności biologicznych była ograniczona. Przeprowadziłem dokładną jakościową i ilościową analizę fitochemiczną połączoną z izolacją i charakterystyką związków występujących w wyciągu. Określiłem struktury trzech dotychczas nieznanych dimerycznych elagotanoidów - salikarinin (salicarinins) A, B oraz C. Pomimo że stanowiły one dominujący składnik wyciągów z ziela krwawnicy, nie były do tej pory opisane. Struktury związków zostały opublikowane w pracy **O10** oraz zaprezentowane na konferencji **K27**. Opracowana została również metoda ilościowego oznaczania dominujących elagotanoidów w ziele krwawnicy z użyciem metody ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem diodowym i detektorem wyładowań koronowych typu CAD, która jest przedmiotem pracy **O8** oraz doniesień zjazdowych **K19** i **K14**.

Ponieważ ziele krwawnicy jest stosowane w stanach zapalnych skóry i błon śluzowych oraz w nieswoistych stanach zapalnych jelit, kolejnym etapem badań było określenie wpływu wyciągu i poszczególnych elagotanoidów na procesy biorące udział w rozwoju stanu zapalnego z użyciem modelu ludzkich neutrofilii. Wykazałem hamujący wpływ wyciągu na uwalnianie i produkcję czynników prozapalnych (cytokin, proteaz oraz reaktywnych form tlenu), a nowo wyizolowane dimeryczne elagotanoidy zostały na podstawie badań porównawczych wytypowane jako związki potencjalnie odpowiedzialne za obserwowaną aktywność. Otrzymane wyniki dla wyciągu z ziela krwawnicy i wyizolowanych elagotanoidów przyczyniły się do potwierdzenia celowości jego tradycyjnego stosowania w terapii chorób o podłożu zapalnym (szczególnie w stanach zapalnych skóry i błon śluzowych) i zostały ujęte w publikacji **O4** oraz zaprezentowane na konferencjach **K12**, **K15**.

Wykazałem po raz pierwszy dla wyciągu z ziela krwawnicy pospolitej, wyciągu z ziela wierzbownicy kosmatej (*Epilobium hirsutum* L., Oenotheraceae) oraz pozostałych wybranych uprzednio do badań bogatych w elagotanoidy roślin leczniczych powstawanie pod wpływem mikrobioty jelitowej człowieka biodostępnych metabolitów (pochodnych dibenzo[*b,d*]piran-6-onu) - urolityn. Wyniki tych badań były przedmiotem publikacji: **O15** i **O5** oraz zaprezentowane na konferencjach **K25**, **K22**, **K20**, **K16**, **K13**.

W celu określenia aktywności biologicznej otrzymanych na drodze syntezy urolityn podjąłem współpracę z prof. Matthiasem Melzigiem z Wolnego Uniwersytetu w Berlinie, gdzie rozpocząłem badania ich wpływu na odpowiedź zapalną makrofagów uzyskanych z linii komórkowej monocytów THP-1. Wykazałem silne hamowanie przez urolityny produkcji cytokin prozapalnych: czynnika martwicy nowotworów TNF- α i interleukiny-6. Przeprowadziłem następnie kompleksowe badania aktywności przeciwzapalnej urolityn na modelu neutrofilii izolowanych z obwodowej krwi ludzkiej. Wykazałem specyficzny oraz zależny od struktury hamujący wpływ na produkcję interleukiny-8, metaloproteinazy macierzy-9 oraz uwalnianie mieloperoksydazy, elastazy i reaktywnych form tlenu. Efekty wywierane przez urolityny na odpowiedź zapalną komórek układu odpornościowego, stwierdzone w stężeniach, jakie mogą one osiągać we krwi, tkankach, kale oraz moczu, przemawiają za celowością doustnego stosowania bogatych w elagotanoidy roślin leczniczych w schorzeniach o podłożu zapalnym (szczególnie we wskazywanych przez tradycyjne źródła chorobach układu krążenia i nieswoistych stanach zapalnych jelit). Wyniki powyższych prac były przedmiotem publikacji **O6** i **O5** oraz zostały zaprezentowane na konferencjach naukowych w formie wystąpień ustnych: **K23**, **K20**, **K8** oraz posterów **K26**.

Prowadziłem również badania aktywności przeciwzapalnej na modelach *in vitro* komórkowych i bezkomórkowych dla wyciągów z ziela wiesiołka dwuletniego (*Oenothera biennis* L.) i wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa* Hudziok) (**O13**, **K28**), ziela czartawy pospolitej (*Circaea lutetiana* L.) (**O14**), liści golterii rozestanej (*Gaultheria procumbens* L.) (**O9**) oraz ziela nasturcji większej (*Tropaeolum majus* L.) (**O12**). Wyizolowałem i zidentyfikowałem dimeryczny elagotanoid agrymoninę z ziela *Potentilla recta*, dla której zostały następnie wykonane badania aktywności biologicznych (**O16**).

Sprawowałem bezpośrednią opiekę nad studentami z koła naukowego. Prowadziliśmy badania składu farmakopealnej substancji roślinnej - ziela rdestu ptasiego (*Polygonum aviculare* L., Polygonaceae). Dzięki zastosowaniu nowoczesnych sprzężonych technik analitycznych (UHPLC-MS/MS, UHPLC-TOF) zrewidowaliśmy dotychczasową wiedzę na temat składu flawonoidów występujących w tej roślinie (**O11**).

Podczas badań prowadzonych w ramach pracy magisterskiej aktywnością wyróżniał się również wyciąg z korzenia i kłącza kuklika pospolitego (*Geum urbanum*

L., Rosaceae). Przeprowadziłem badania fitochemiczne, które doprowadziły do dokładnego określenia składu, wyizolowania i określenia struktury sześciu dominujących elagotanoidów i trzech pochodnych kwasu elagowego. Następnie przeprowadziłem wstępne badania aktywności przeciwzapalnej z użyciem komórkowych modeli *in vitro* dla tego wyciągu, które mogą tłumaczyć zewnętrzne stosowanie tego surowca w leczeniu stanów zapalnych skóry i błon śluzowych. Wyniki badań były przedmiotem publikacji **O7** oraz zaprezentowane na konferencjach naukowych **K30, K23, K18, K17, K11**.

b) działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora skupiłem się na dalszej pracy badawczej związanej z rozpoznaniem czynników warunkujących właściwości przeciwzapalne produktów pochodzenia naturalnego zawierających elagotanoidy. Przygotowałem projekt badawczy: „Badania wpływu urolityn - biodostępnych metabolitów flory jelitowej człowieka na molekularne procesy związane z wygaszaniem stanu zapalnego”, który otrzymał finansowania z MNiSW w ramach programu luventus Plus. Dzięki otrzymanemu finansowaniu wykonałem część badań stanowiących przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe (**P3** i **P4**).

Podczas pobytu badawczego w Instytucie Farmacji na Uniwersytecie w Innsbrucku zajmowałem się izolacją i identyfikacją głównych składników seskwiterpenowych oraz polifenolowych występujących w częściach nadziemnych sadzka konopiastego (*Eupatorium cannabinum* L.). Obecnie sprawuję opiekę merytoryczną nad badaniami molekularnych mechanizmów aktywności przeciwzapalnej wyizolowanych związków (prace prowadzone w ramach projektów **G2** i **G3**).

Wykonałem badania aktywności przeciwzapalnej stilbenoidów i benzyloftalidów wyizolowanych z *Tragopogon tommasinii* Sch.Bip. Badania wykazały hamujący wpływ niektórych związków na wywołaną LPS zwiększoną produkcję cytokin prozapalnych: IL-8, TNF- α , i IL-1 β oraz odpowiedzialnej za rozkład macierzy zewnątrzkomórkowej MMP-9. Najsilniejszą aktywność wykazywały dwa związki: 7-(1 \rightarrow 6)- α -rhamnosyl- β -glucopyranosyloxy-(S)-3-(4-hydroxybenzyl)-5-methoxyphthalide oraz 3-caffeoyl-(9 \rightarrow 5)- β -apiosyl-(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranosyloxydemethoxycannabispiradienone, prawdopodobnie ze względu na przyłączony łańcuch zawierający co najmniej 2 reszty cukrowe oraz 3-Caffeoyl-(9 \rightarrow

5)- β -apiosyl-(1 → 6)- β -glucopyranosyloxy-4'-dihydroxy-5,3'-dimethoxy-bibenzyl prawdopodobnie ze względu na metylację węgla w pozycji 9. Wyniki badań zostały włączone do publikacji **O3**.

Brałem udział w badaniach fitochemicznych połączonych z pracami izolacyjnymi parzydła leśnego (*Aruncus dioicus* (Walter) Fernald), których rezultatem były publikacje **O1** i **O2** oraz doniesienie zjazdowe **K6**.

Kontynuowałem współpracę dr hab. Michałem Tomczykiem z Zakładu Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w zakresie badań aktywności biologicznych agrymoniny (**K1**) oraz brałem udział w przygotowywaniu pracy przeglądowej dotyczącej aktywności biologicznych agrymoniny opracowując część dotyczącą metabolizmu i biodostępności.

We współpracy z dr Katarzyną Szewczyk z Katedry Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytetu Medycznego w Lublinie badałem aktywność przeciwzapalną wyizolowanych polisacharydów na modelu ludzkich neutrofilii

Zajmowałem się również przygotowywaniem projektu badawczego we współpracy z Instytutem Farmaceutycznym oraz Instytutem Żywienia Zwierząt Wolnego Uniwersytetu w Berlinie, opiekunami naukowymi projektu są prof. Matthias Melzig i prof. Jürgen Zentek. Przygotowany dwuletni projekt badawczy „Ellagitannin-rich natural products as agents modulating host:microbiota interactions” dotyczący badania wpływu produktów pochodzenia naturalnego zawierających elagotanoidy na interakcje pomiędzy mikrobiotą jelitową a gospodarzem otrzymał finansowanie z Fundacji Aleksandra von Humboldta.

6. Pozostałe publikacje oryginalne

- O1.** Granica, S., Fusani, P., Stanisławska, I., Piwowarski, J.P., Melck, D., Motta, A., Zidorn, C. (2017): Monoterpenoids from the traditional North Italian vegetable *Aruncus dioicus* (Walter) Fernald var. *vulgaris* (Maxim.) H.Hara (Rosaceae). *Food Chemistry* 15: 1851-1859
- O2.** Fusani, P., Piwowarski, J.P., Zidorn, C., Kiss, A.K., Scartezzini, F., Granica, S. (2016): Seasonal variation in secondary metabolites of edible shoots of Buck's beard [*Aruncus dioicus* (Walter) Fernald (Rosaceae)]. *Food Chemistry* 202: 23-30
- O3.** Granica, S., Piwowarski, J.P., Randazzo, A., Schneider, P., Zyzynska-Granica, B., Zidorn, C. (2015): Novel stilbenoids, including cannabispiradienone glycosides, from *Tragopogon tommasinii* (Asteraceae, Cichorieae) and their potential anti-inflammatory activity. *Phytochemistry* 117: 254-266
- O4.** Piwowarski, J.P., Kiss, A.K. (2015): C-glucosidic ellagitannins' contribution to *Lythrum salicaria* L. influence on pro-inflammatory functions of human neutrophils. *Journal of Natural Medicines* 69: 100-110
- O5.** Piwowarski, J.P., Granica, S., Zwierzyńska, M., Stefańska, J., Schopohl, P., Melzig, M.F., Kiss, A.K. (2014): Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. *Journal of Ethnopharmacology* 155: 801-809
- O6.** Piwowarski, J.P., Granica, S., Kiss, A.K. (2014): Influence of gut microbiota-derived ellagitannins' metabolites urolithins on pro-inflammatory activities of human neutrophils. *Planta Medica* 80: 887-895
- O7.** Piwowarski, J.P., Granica, S., Kosiński, M., Kiss, A.K. (2014): Secondary metabolites from roots of *Geum urbanum* L. *Biochemical Systematics and Ecology* 53: 46-50
- O8.** Granica, S., Piwowarski, J.P., Kiss, A.K. (2014): Determination of C-glucosidic ellagitannins in *Lythri salicariae* herba by ultra-high performance liquid chromatography coupled with charged aerosol detector: method development and validation. *Phytochemical Analysis* 25: 201-206
- O9.** Michel, P., Dobrowolska, A., Kicel, A., Owczarek, A., Bazyłko, A., Granica, S., Piwowarski, J.P., Olszewska, M.A. (2014): Polyphenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory activity of eastern teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) leaf extracts. *Molecules* 19: 20498-20520

- O10.** Piwowarski, J.P., Kiss, A.K. (2013): C-glucosidic ellagitannins from *Lythri herba* (Ph. Eur.). Chromatographic profile and structure determination. *Phytochemical Analysis* 24: 336-348
- O11.** Granica, S., Piwowarski, J.P., Popławska, M., Jakubowska, M., Borzym, J., Kiss, A.K. (2013): Novel insight into qualitative standardization of *Polygoni avicularis herba* (Ph. Eur.), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 72: 216-222
- O12.** Bazyłko, A., Granica, S., Filipek, A., Piwowarski, J.P., Stefańska, J., Osińska, E., Kiss, A.K. (2013): Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L. *Industrial Crops and Products* 50: 88-94
- O13.** Granica, S., Czerwińska, M.E., Piwowarski, J.P., Ziaja, M., Kiss, A.K. (2013) Chemical composition, antioxidative and anti-inflammatory activity of extracts prepared from aerial parts of *Oenothera biennis* L. and *Oenothera paradoxa* Hudziok obtained after seeds cultivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 801-810
- O14.** Granica, S., Piwowarski, J.P., Kiss, A.K. (2013): Polyphenol composition of extract from aerial parts of *Circaea lutetiana* L. and its antioxidant and anti-inflammatory activity *in vitro*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 55: 1-8
- O15.** Stolarczyk, M., Piwowarski, J.P., Granica, S., Stefańska, J., Naruszewicz, M., Kiss, A.K. (2013): Extracts from *Epilobium* sp. herbs, their components and gut microbiota metabolites of Epilobium ellagitannins, urolithins, inhibit hormone-dependent prostate cancer cells-(LNCaP) proliferation and PSA Secretion. *Phytotherapy Research* 27: 1842-1848
- O16.** Bazyłko, A., Piwowarski, J.P., Filipek, A., Bonarewicz, J., Tomczyk, M. (2013): *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Potentilla recta* and its ellagitannin, agrimoniin. *Journal of Ethnopharmacology* 149: 222-227
- O17.** Piwowarski, J.P., Kiss, A.K., Kozłowska-Wojciechowska, M. (2011): Anti-hyaluronidase and anti-elastase activity screening of tannin-rich plant materials used in traditional Polish medicine for external treatment of diseases with inflammatory background. *Journal of Ethnopharmacology* 137: 937-941
- O18.** Kiss, A.K., Bazyłko, A., Filipek, A., Granica, S., Jaszewska, E., Kiarszys, U., Kośmider, A., Piwowarski, J. (2011): Oenothetin B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of *Epilobium* sp. *Phytomedicine* 18: 557-560

7. Pozostałe prace przeglądowe

- R1.** Piwowarski, J.P., Melzig, M.F. (2016): Der Gewöhnliche Blutweiderich *Lythrum salicaria* L. *Zeitschrift für Phytotherapie* 37:275-279
- R2.** Piwowarski, J.P., Granica, S., Kiss, A.K. (2015): *Lythrum salicaria* L.-underestimated medicinal plant from European traditional medicine. A review. *Journal of Ethnopharmacology* 170: 226-250
- R3.** Granica, S., Piwowarski, J.P., Czerwińska, M.E., Kiss, A.K. (2014): Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): A review. *Journal of Ethnopharmacology* 156: 316-346
- R4.** Piwowarski J.P., Kiss A.K., Naruszewicz M. (2013): Substancje roślinne i związki pochodzenia naturalnego w prewencji i terapii chorób układu sercowo-naczyniowego. *Czynniki Ryzyka* 75: 17-27.
- R5.** Piwowarski J.P. (2010): Substancje pochodzenia naturalnego hamujące aterogenny stan zapalny w naczyniach krwionośnych wywołany hiperglikemią. *Czynniki Ryzyka* 66: 39-46.

8. Udział w międzynarodowych lub krajowych konferencjach naukowych

- K1.** Surażynski, A.; Rysiak, E.; Bazyłko, A.; Piwowarski, J.; Janowski, H.; Tomczyk, M. Agrimoniin up-regulates collagen biosynthesis through increase in expression of β 1-integrin receptor and prolidase activity in cultured human skin fibroblasts. 9th Joint Natural Products Conference 2016. 24.07.2016-27.07.2016. Kopenhaga, Dania, *Planta Medica* 2016; 81(S01):S1-S381
- K2.** Piwowarski, J.P.; Granica, S.; Stefańska, J.; Kiss, A.K. Metabolic fate of ellagitannins in human gut microbiota ex vivo cultures. 9th Joint Natural Products Conference 2016. 24.07.2016-27.07.2016. Kopenhaga, Dania, *Planta Medica* 2016; 81(S01):S1-S381
- K3.** Stanisławska, I.J.; Granica, S.; Piwowarski, J.P.; Szawkało, J.; Wiązecki, K.; Czarnocki, Z.; Kiss, A.K. 5-(3',4',5'-trihydroxyphenyl)- γ -valerolactone and nasutin A inhibit LNCaP prostate cancer cell proliferation. 9th Joint Natural Products Conference 2016. 24.07.2016-27.07.2016. Kopenhaga, Dania, *Planta Medica* 2016; 81(S01):S1-S381

- K4.** Piwowarski, J.P.; Granica, S.; Melzig, M.F.; Woźniak, M.; Moeslinger, T.; Kiss A.K. Contribution of human gut microbiota metabolism in anti-inflammatory activities of ellagitannin-rich medicinal plants. 3rd World Congress on Targeting Microbiota. 21.10.2015-23.10.2015. Instytut Pasteura, Paryż, Francja, **wystąpienie ustne**
- K5.** Granica, S.; Kłębowska, A.; Piwowarski, J.P.; Dudek, M.; Kiss, A.K. Effects of selected tannins on neutrophils functions. Significance in periodontal diseases. 4th International Conference and Workshop – Plant – the source of research material. 20.09.2015-23.09.2015. Lublin, Polska
- K6.** Granica, S.; Fusani, P.; Ziodrn, C.; Piwowarski, J.P.; Kiss, A.K. Isolation and identification of monoterpenoids from *Aruncus dioicus* (Walter) Fernald. 4th International Conference and Workshop – Plant – the source of research material. 20.09.2015-23.09.2015. Lublin, Polska
- K7.** Piwowarski, J.P.; Kiss A.K.; Granica, S.; Moeslinger, T. Influence of urolithins on inflammatory response of RAW 264.7 murine macrophages. 63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 23.08.2015-27.08.2015, Budapeszt, Węgry, *Planta Medica* 2015;81: PW_63
- K8.** Piwowarski, J.P.; Granica, S.; Kiss A.K. Influence of gut microbiota-derived ellagitannins' metabolites urolithins on pro-inflammatory activities of human neutrophils. 63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 23.08.2015-27.08.2015, Budapeszt, Węgry, **wystąpienie ustne na zaproszenie**
- K9.** Granica, S.; Piwowarski, J.P.; Kiss, A.K. The influence of tannins on the human neutrophils' pro-inflammatory mediators. 63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 23.08.2015-27.08.2015, Budapeszt, Węgry, *Planta Medica* 2015; 81:PM_25
- K10.** Granica, S.; Piwowarski, J.P.; Randazzo, A.; Schneider, P.; Żyżyńska-Granica, B.; Zidorn, C. Anti-inflammatory stilbenoids and cannabispiradienone derivatives *Tragopogon tommasinii* Sch.Bip. from *Tragopogon tommasinii* Sch.Bip. 63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for

Medicinal Plant and Natural Product Research. 23.08.2015-27.08.2015, Budapeszt, Węgry, *Planta Medica* 2015; 81:SL4A_04

K11. Granica, S.; Piwowarski, J.P.; Kiss, A.K. Isolation of tannins from *Agrimonia eupatoria*, *Lythrum salicaria* and *Geum urbanum* and their influence on the release of elastase from stimulated human neutrophils – structure-activity studies. 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 31.08.2014-04.09.2014, Guimaraes, Portugalia, *Planta Medica* 2014;80(16):P1L26

K12. Piwowarski, J.P.; Kiss, A.K. Activity of C-glucosidic ellagitannins from *Lythrum salicaria* L. supporting its traditional use in external treatment of inflammatory associated diseases. 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 31.08.2014-04.09.2014, Guimaraes, Portugalia, *Planta Medica* 2014;80(16):P1L15

K13. Piwowarski, J. P.; Granica S.; Zwierzyńska, M., Stefańska, J.; Kiss, A.K., Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 31.08.2014-04.09.2014, Guimaraes, Portugalia, *Planta Medica* 2014;80(16):P2B71

K14. Granica, S.; Piwowarski, J. P.; Kłębowska, A.; Krupa, K.; Kiss, A.K; Phytochemical investigations of *Polygonum aviculare*, *Agrimonia eupatoria* and *Lythrum salicaria* by HPLC-DAD-MS³-CAD method – application of corona charged aerosol detection (CAD) for analysis of plant phenolics. 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 31.08.2014-04.09.2014, Guimaraes, Portugalia, *Planta Medica*. 2014;80(16):P2O61

K15. Piwowarski, J. P.; Kiss, A.K, Anti-inflammatory activity of C-glucosidic ellagitannins from *Lythrum salicaria* L, *Plant in Pharmacy and Nutrition* 2014, The International Young Scientists Symposium, 30.05.2014, Wrocław, Polska, **wystąpienie ustne**

- K16.** Piwowarski, J. P.; Granica S.; Zwierzyńska, M., Stefańska, J.; Kiss, A.K., Determination of human gut microbiota metabolism of traditionally used ellagitannin-rich medicinal plant materials by HPLC-DAD-MS/MS method, 9th International Symposium on Chromatography of Natural Products, 26.05.2014-29.05.2014, Lublin, Polska
- K17.** Kiss, A.K.; Kłębowska, A.; Piwowarski, J. P.; Kosiński, M.; Granica S, Identification of compounds from *Geum urbanum* roots affecting the expression of interin CD11b in human neutrophils, 9th International Symposium on Chromatography of Natural Products, 26.05.2014-29.05.2014, Lublin, Polska
- K18.** Piwowarski, J. P.; Granica S.; Kiss, A.K., Isolation and identification of tannins from domestic plant materials and their influence on release of elastase from stimulated human neutrophils, 9th International Symposium on Chromatography of Natural Products, 26.05.2014-29.05.2014, Lublin, Polska
- K19.** Granica, S.; Piwowarski, J. P.; Kłębowska, A.; Krupa, K.; Kiss, A.K, The qualitative and quantitative analysis of chemical composition of some pharmacopeial plant materials with HPLC-DAD-MS³-CAD. The application of corona charged aerosol detector (CAD) in the analysis of plant phenolics, 9th International Symposium on Chromatography of Natural Products, 26.05.2014-29.05.2014, Lublin, Polska
- K20.** Piwowarski, J.P.; Granica, S.; Melzig, M.F.; Woźniak, M.; Moeslinger, T.; Kiss A.K. Wpływ metabolitów elagotanoidów-urolityn na prozapalną aktywność neutrofilii w kontekście chorób układu sercowo-naczyniowego. XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego. 18.09.2013-21.09.2013. Białystok, Polska, **wystąpienie ustne**
- K21.** Bazyłko, A.; Piwowarski, J.P.; Tomczyk, M. Agrymonina, elagotanina wyizolowana z *Potentilla recta*, jej aktywność przeciwutleniająca i przeciwzapalna. XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego. 18.09.2013-21.09.2013. Białystok, Polska
- K22.** Kiss, A.K.; Stolarczyk, M.; Piwowarski, J.; Granica, S. Effects of standardized extracts from *Epilobium* sp. Herbs on hormone-dependent prostate cancer cells (LNCaP)- searching for active compounds. XVIIIth

International Congress of The Polish Pharmacological Society. 23.05.2013-25.05.2013. Kazimierz Dolny, Polska, Pharmacological Reports. 2013,65:13

- K23.** Piwowarski, J.P.; Granica, S.; Kiss, A.K. Isolation of ellagitannins from *Gei urbani radix cum rhizoma* and determination of extract's anti-inflammatory activity. 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 01.09.2013-05.09.2013. Munster, Germany, Planta Medica. 2013;79(13):PC12
- K24.** Piwowarski, J.P.; Granica, S.; Kiss, A.K. Influence of gut flora-derived ellagitannins' metabolites - urolithins on production and release of pro-inflammatory factors from stimulated neutrophils in the context of cardiovascular disease prevention. 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 01.09.2013-05.09.2013. Munster, Germany, Planta Medica. 2013;79(13):SL52, **wystąpienie ustne**
- K25.** Kiss, A.K., Granica, S. oraz Piwowarski, J.P. Effects of *Epilobium* sp. main constituents and ellagitannins metabolites, urolithins, on proliferation and prostate specific antigen (PSA) secretion in prostate cancer cells (LNCaP). 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 01.09.2013-05.09.2013. Munster, Germany, Planta Medica. 2013;79(13):PJ25
- K26.** Piwowarski, J.; Granica, S.; Kiss, A.K. Influence of urolithins on prevention and extracellular matrix degradation triggered by stimulated neutrophils. The 17th International Congress Phytopharm 2013. 08.07.2013-10.07.2013. Wiedeń, Austria
- K27.** Piwowarski, J.P.; Kiss, A.K. C-glucosidic ellagitannins from *Lythri herba* (ph. eur.) and their microbial metabolites. 8th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, International Congress on Natural Products Research. 28.07.2012-01.08.2012. New York, USA, Planta Medica. 2012;78(11):PJ138
- K28.** Granica, S.; Czerwińska, M.E.; Piwowarski, J.P.; Kiss, A.K. Chemical composition and biological activities of *Oenothera biennis* L. and *Oenothera paradoxa* Hudziok aerial parts' extracts. 8th Joint Meeting of AFERP, ASP,

GA, PSE & SIF, International Congress on Natural Products Research. 28.07.2012-01.08.2012. New York, USA, *Planta Medica*. 2012;78(11):PI268

K29. Stolarczyk, M.; Piwowarski, J.; Granica, S.; Naruszewicz, M.; Kiss, A.K. The influence of standardized extracts from *Epilobium* sp. herbs on apoptosis of hormone dependent prostate cancer cells (LNCAP). 2nd International Conference and Workshop – Plant – the source of reaserch material. 18.10.2012-20.10.2012. Lublin, Poland

K30. Piwowarski, J.; Granica, S.; Kosiński, M.; Kiss, A.K. Phytochemical screening of *Gei urbani radix cum rhizoma* and its anti ECM degrading activity. 2nd International Conference and Workshop – Plant – the source of research material. 18.10.2012-20.10.2012. Lublin, Poland

K31. Kiss, A.K.; Kiarszys, U.; Piwowarski, J.; Staszewska, A.; Bazyłko A. Contribution of oenothain B in the anti-inflammatory activity of *Epilobium* sp. Extracts. 56th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research and 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF "Natural Products with Pharmaceutical, Nutraceutical, Cosmetic and Agrochemical Interest". 03.08.2008-08.08.2008. Ateny, Grecja

9. Współpraca naukowa

W1. współpraca z Institut für Pharmazie/Pharmazeutische Biologie, Freie Universität Berlin (prof. Matthias F. Melzig) w zakresie badania aktywności przeciwzapalnej metabolitów produkowanych przez mikrobiotę jelitową.

W2. współpraca z Institut für Physiologie, Medizinische Universität Wien (prof. Thomas Moeslinger) w zakresie badania molekularnych mechanizmów aktywności przeciwzapalnej urolityn.

W3. współpraca z Katedrą Farmakognozji, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (dr hab. Michał Tomczyk) w zakresie badania aktywności biologicznych elagotanoidu agrymoniny.

W4. współpraca z Katedrą Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie (dr Katarzyna Szewczyk) w zakresie badania aktywności przeciwzapalnej izolowanych polisacharydów.

W5. współpraca z Instytutem Farmacji/Farmakognozji Uniwersytetu w Innsbrucku (prof. Hermann Stuppner oraz dr Birgit Waltenberger) w zakresie izolacji związków polifenolowych oraz seskwiterpenowych z *Eupatorium cannabinum* L.

W6. współpraca z Department of Biochemistry, McGill University w Toronto (prof. Jerry Pelletier) dotycząca badania wpływu urolityn na procesy translacji.

10. Udział w projektach badawczych

G1. Od 08.2016 **kierownik projektu** „Badania wpływu urolityn-biodostępnych metabolitów flory jelitowej człowieka na molekularne procesy związane z wygaszaniem stanu zapalnego” projekt MNiSW w ramach konkursu Iuventus Plus 0622/IP1/2016/74; realizowany w latach 2016-2019

G2. 2016-2019 **wykonawca projektu** „Poszukiwanie nowych związków o aktywności przeciwzapalnej z rodzimych gatunków roślin należących do rodziny Oleaceae z użyciem modeli in vitro i in vivo wraz ze wskazaniem molekularnych mechanizmów warunkujących obserwowaną aktywność” projekt NCN w ramach konkursu OPUS 2015/17/B/NZ7/03086

G3. 2015-2017 **wykonawca projektu** „Identification of interleukin-8 (IL-8) inhibitors from natural sources as potential anti-inflammatory agents for the treatment of respiratory tract diseases” projekt na wymianę osobową w ramach Protokołu wykonawczego z Republiką Austrii na lata 2015-2017

G4. 07.2013-07.2015 **wykonawca projektu** „Wpływ wybranych elagotanoidów na funkcje ludzkich neutrofilów w kontekście prewencji i leczenia chorób jamy ustnej - badania struktura a aktywność” projekt NCN w ramach konkursu Preludium 2012/07/N/NZ7/01136

G5. 09.2013-09.2014 **kierownik projektu** „Ziele krwawnicy (Lythri herba)- określenie wpływu wyciągu, izolowanych elagotanoidów oraz ich metabolitów na prozapalne funkcje neutrofilów” projekt NCN w ramach konkursu Etiuda 3/08/T/NZ7/00011

- G6.** 06.2012-12.2014 **wykonawca projektu** „Czy wyciągi pozyskiwane z *Epilobium* sp. mogą hamować proliferację komórek prostaty LNCaP poprzez wpływ na aktywność acetylotransferazy histonowej (HAT)?” Projekt Sonata NCN 2011/01/D/NZ4/01261
- G7.** 06.2012-08.2014 **kierownik projektu** „Wpływ metabolitów elagotanoidów produkowanych przez bakterie flory jelitowej- urolityn na prozapalną aktywność neutrofilii w kontekście chorób układu sercowo naczyniowego.” Projekt Preludium NCN 2011/03/N/NZ7/01785
- G8.** 07.2009-03.2010 **kierownik i wykonawca projektu** „Badanie hamowania aktywności hialuronidazy przez wyciągi wodne z surowców garbnikowych jako potencjalnych składników preparatów przydatnych w terapii wczesnych stadiów choroby hemoroidalnej.” mini-grant studencki przyznany przez Warszawski Uniwersytet Medyczny nr FW 25/NM1/2009

11. Staże naukowe

- N1.** 11.2015 – Austria, Innsbruck, Uniwersytet w Innsbrucku, Instytut Farmacji, jednomiesięczny staż naukowy pod opieką prof. Hermana Stuppnera w ramach programu MNiSW wymiany osobowej z Republiką Austrii
- N2.** 02.2014 - 08.2014 – Austria, Wiedeń, Institut für Physiologie, Medizinische Universität Wien, sześciomiesięczny staż naukowy pod opieką prof. Thomasa Moeslingera; stypendium w ramach projektu NCN ETIUDA 2013/08/T/NZ7/00011
- N3.** 02.2012-05.2012 oraz 05.2013-06.2013 – Niemcy, Berlin, Institut für Pharmazie, Freies Universität Berlin, trzymiesięczny i dwumiesięczny pobyt naukowy pod opieką prof. Matthiasa Melziga; stypendium w ramach programu praktyk LLP-Erasmus
- N4.** 09.2008 – Polska, Kraków, Instytut Farmakologii PAN, Zakład Fitochemii, jednomiesięczny staż naukowy pod opieką dr hab. Anny Stojakowskiej

12. Nagrody i stypendia za działalność naukową

- ST1.** 12.2016 – Stypendium podoktorskie Fundacji Alexandra von Humboldta
- ST2.** 07.2016 – nagroda naukowa I stopnia przyznana przez JM Rektora WUM za „pracę przedstawiającą wyniki badań dotyczących wpływu metabolitów flory jelitowej- urolityn na odpowiedź prozapalną makrofagów”
- ST3.** 05.2016 – stypendium START dla młodych uczonych finansowane przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej
- ST4.** 10.2015 – nagroda przyznana przez JM Rektora WUM za udział w oryginalnych i twórczych badaniach naukowych w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii.
- ST5.** 09.2015 – nagroda przyznana przez edytorów czasopisma *Planta Medica* za pracę „Influence of gut microbiota-derived ellagitannins’ metabolites urolithins on pro-inflammatory activities of human neutrophils” jako najbardziej innowacyjny artykuł opublikowany w 2014 roku.
- ST6.** 11.2014 – nagroda naukowa II stopnia przyznawana przez JM Rektora WUM za współautorstwo w cyklu publikacji pt.: „Badania składu surowców roślinnych metodami chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas oraz metodą magnetycznego rezonansu jądrowego, ze szczególnym uwzględnieniem flawonoidów i elagotanoidów”
- ST7.** 09.2014- nagroda za najlepszy plakat (Role of human gut microbiota metabolism in anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials) na 62nd congress of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 31.08.2014-04.09.2014, Guimaraes, Portugal.
- ST8.** 12.2013 – stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla najlepszych doktorantów za osiągnięcia naukowe
- ST9.** 11.2013 – nagroda naukowa II stopnia przyznana przez JM Rektora WUM za współautorstwo w cyklu publikacji pt.: „ Badania składu surowców roślinnych metodami chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas oraz metodą magnetycznego rezonansu jądrowego, ze szczególnym uwzględnieniem flawonoidów i elagotanoidów”

ST10. 10.2013-09.2014 – stypendium doktorskie w ramach programu Etiuda organizowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

ST11. 09.2011-06.2012, 09.2012-06.2013 oraz 09.2013-06.2014 – stypendium JM Rektora WUM dla najlepszych doktorantów za osiągnięcia naukowe

13. Kursy i szkolenia

S1. 09.2011 – Letni kurs hodowli komórek; Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

S2. 02.2011 – Real-time PCR; Wydział Nauki o Zwierzętach, SGGW, Warszawa

S3. 08.2010 –jednotygodniowe szkolenie z zakresu metody HPLC-MS, Bruker Daltonics, Brema, Niemcy

14. Członkostwo w towarzystwach naukowych

C1. od 2013 roku jestem członkiem the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA)

15. Działalność organizacyjna

Od października 2016 roku jestem członkiem Komisji Socjalnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

16. Recenzje prac naukowych

Od grudnia 2011 występowałem w roli recenzenta:

- 36 prac naukowych złożonych do publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Scientific Reports* (1), *Phytochemistry Letters* (2), *Pancreatology* (1), *Medicinal Research Reviews* (1), *Journal of Food Science* (1), *Journal of Functional Foods* (2), *Journal of Ethnopharmacology* (4), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (4), *Food and Function* (4), *European Journal of Nutrition* (2), *Acta Physiologiae Plantarum* (2), *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (1), *Journal of Medicinal Plant Research* (1), *Austin Chromatography* (1), *International Journal of*

Molecular Sciences (1), *Molecules* (2), *International Journal of Nanomedicine* (1), *British Journal of Nutrition* (1)

- 2 projektów badawczych
 - Research Program Korea Israel Cooperative Scientific Research on Brain Sciences, Ministry of Science, Technology and Space, Israel (2016)
 - Diamentowy Grant, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2016)

17. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek naukowy obejmuje:

- 24 prace oryginalne opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR). W 12 pracach byłem pierwszym autorem bądź pełniłem rolę autora korespondencyjnego.
- 6 prac przeglądowych z czego 3 zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR). W czterech pracach byłem pierwszym autorem.
- 31 streszczeń z prezentowanych doniesień na konferencjach naukowych w tym 5 przedstawionych w formie wystąpienia ustnego
- udział w 8 projektach badawczych finansowanych przez NCN/MNiSW/WUM.
- sumaryczny współczynnik *Impact Factor* według listy JCR zgodnie z rokiem opublikowania **76.214**; łączna punktacja MNiSW: **890** pkt
- liczba wszystkich cytowań publikacji według bazy *Web of Science™ Core Collection*: **237** (**266** wg bazy *Scopus*)
- liczba cytowań (bez autocytowań) według bazy *Web of Science™ Core Collection*: **189** (**218** wg bazy *Scopus*)
- index Hirsha (*h-index*) według *Web of Science™ Core Collection*: **10** (**10** wg bazy *Scopus*)

18. Działalność dydaktyczna i popularyzująca naukę

a) działalność dydaktyczna

- prowadzenie zajęć z mikroskopowej identyfikacji surowców roślinnych dla III roku kierunku farmacja
- prowadzenie zajęć fitochemicznych dla studentów III roku kierunku farmacja

- prowadzenie części wykładów dla III roku kierunku farmacja
 - promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej mgr farm. Iwony Stanisławskiej pt.: „Wpływ metabolitów garbników z grupy elagotanoidów i pochodnych flawan-3-olu na proliferację komórek linii raka prostaty LNCaP”
 - opieka nad pracą magisterską mgr farm. Bartosza Kowalczyka „Badania fitochemiczne ziela świetlika (*Euphrasia rostkoviana* Hayne) połączone z analizą jakościową wybranych produktów zawierających ziele świetlika.”
 - opieka nad członkami studenckiego koła naukowego przy Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii; co roku opieka nad 1-2 studentów; efektem opieki nad studentami jest artykuł **O5** i **O11** oraz doniesienia zjazdowe **K4** i **K20**
 - prowadzenie zajęć z zakresu preparatyki fitochemicznej dla studentów IV roku kierunku farmacja w ramach fakultatywnych bloków programowych Fitochemia i Fitoterapia oraz Farmacja Analityczna
 - wykonanie recenzji jednej pracy magisterskiej wykonywanej w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii WUM
- b) działalność popularyzatorska
- opieka naukowa nad projektem „Twórczość w przyrodzie” prowadzonym przez dr hab. Bogusława Bachorczyka z Akademii Sztuk Pięknych im. Jana Matejki w Krakowie. Projekt realizowany w Bałtyckiej Galerii Sztuki w Ustce.
 - opieka nad ćwiczeniami prowadzonymi w ramach Uniwersytetu Dzieci

Jakub Piwowarski