Załącznik nr 2

do wniosku

o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

*w **dziedzinie nauk farmaceutycznych***

*(specjalność: **farmakognozja**)*

Monika Ewa Czerwińska

Autoreferat

Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 2018

1. Monika Ewa Czerwińska

Nazwisko rodowe: Mańk

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe oraz tytuł rozprawy doktorskiej

Dyplom i tytuł zawodowy magistra farmacji – uzyskany 2 kwietnia 2007 roku na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Warszawie na podstawie obronionej pracy magisterskiej pt. „Inhibicja aktywności metalopeptydaz przez wyciągi z owoców ligustra (*Ligustri fructus*)", promotor pracy: prof. dr hab. n. farm. Marek Naruszewicz, opiekun pracy: dr n. farm. Anna Kiss.

Stopień doktora nauk farmaceutycznych – nadany 11 czerwca 2014 roku uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej pt. „Porównanie wpływu oleuropeiny i jej pochodnej oleaceiny na produkcję reaktywnych form tlenu oraz inne funkcje ludzkich neutrofili"; promotor w przewodzie doktorskim: prof. dr hab. n. farm. Marek Naruszewicz, promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim: dr hab. n. farm. Anna Kiss; recenzenci w przewodzie doktorskim: dr hab. n. farm. Mirosława Krauze-Baranowska, dr hab. n. med. Rafał Olszanecki; praca otrzymała wyróżnienie Rady Wydziału Farmaceutycznego w Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej WUM.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Od 07.2014 adiunkt – pracownik naukowo-dydaktyczny w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

02.2013 – 06.2014 asystent – pracownik naukowo-dydaktyczny w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

11.2011 - 01. 2013 pracownik inżynieryjno-techniczny w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Analiza fitochemiczna wybranych substancji roślinnych z rodzin Oleaceae, Lamiaceae i Cornaceae oraz badanie potencjalnej aktywności przeciwzapalnej i przeciwcukrzycowej związków w nich występujących - irydoidów, fenylopropanoidów oraz flawonoidów.

b) cykl prac i patentów zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego (autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

H1. Czerwińska M.E., Ziarek M., Bazylko A.*, Osińska E., Kiss A.K.

Quantitative determination of secoiridoids and phenylpropanoids in different extracts of *Ligustrum vulgare* L. leaves by a validated HPTLC-photodensitometry method.

Phytochemical Analysis 2015, 26: 253-260 (**IF$_{2015}$ - 2,497; MNiSW – 30 pkt.**)

Mój udział polegał na zaplanowaniu badania, opiece merytorycznej podczas wykonywania części eksperymentalnej, analizie statystycznej wyników eksperymentów oraz przygotowaniu tekstu manuskryptu wraz tabelami i rycinami. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

H2. Czerwińska M.E.*, Duszak K., Parzonko A., Kiss A.K.

Chemical composition and UVA-protecting activity of extracts from *Ligustrum vulgare* and *Olea europaea* leaves.

Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 2016, 58(2): 45-55 **(IF$_{2016}$ – 0,491; MNiSW 15 pkt.)**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na zaplanowaniu i częściowym wykonaniu eksperymentów biologicznych opisanych w pracy, opiece merytorycznej podczas wykonywania badań (analiza statystyczna, interpretacja wyników eksperymentów biologicznych i oznaczeń chromatograficznych), przygotowaniu tekstu manuskryptu wraz z tabelami i rycinami oraz korespondencja z wydawcą. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

H3. Czerwińska M.E.*, Świerczewska M., Woźniak M., Kiss A.K.

Bio-assay guided isolation of iridoids and phenylpropanoids from aerial parts of *Lamium album* and their anti-inflammatory activity in human neutrophils.

Planta Medica 2017, 83: 1011-1019 **(IF$_{2017}$ - 2,494; MNiSW 25 pkt.)**

Mój udział polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej (izolacja i udział w ustaleniu struktury wyizolowanych związków, udział w przeprowadzeniu badań biologicznych wyizolowanych związków, przeprowadzenie oznaczeń, analiza statystyczna i interpretacja wyników) oraz przygotowaniu tekstu manuskryptu wraz tabelami i rycinami, a także *korespondencja z wydawcą. Mój udział procentowy szacuję na 85%.*

H4. Czerwińska M.E., Gąsińska E., Leśniak A., Krawczyk P., Kiss A.K., Naruszewicz M., Bujalska-Zadrożny M.*

Inhibitory effect of *Ligustrum vulgare* leaf extract on the development of neuropathic pain in a streptozotocin-induced rat model of diabetes.

Phytomedicine 2018, 49: 75-82 (**IF$_{2017}$ 3,610; MNiSW – 40 pkt.**)

Mój udział polegał na zaplanowaniu oraz wykonaniu części eksperymentalnej związanej z analizą ilościową i jakościową ekstraktu, które zostały zilustrowane na rycinie 1. oraz w tabelach 1. i 2., a także na przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz materiałów pomocniczych. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

H5. Świerczewska A., Buchholz T., Melzig M.F., Czerwińska M.E.*

***In vitro* α-amylase and pancreatic lipase inhibitory activity of *Cornus mas* L. and *Cornus alba* L. fruit extracts.**

Journal of Food and Drug Analysis 2018, DOI 10.1016/j.jfda.2018.06.005 (**IF$_{2017}$ 2,852; MNiSW – 20 pkt.**)

Mój udział polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej, opiece merytorycznej podczas wykonywania badań (przeprowadzenie oznaczeń, analiza statystyczna i interpretacja wyników) oraz przygotowaniu tekstu manuskryptu, a także korespondencja z wydawcą. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

H6. Czerwińska M.E.*, Melzig M.F.*

***Cornus mas* and *Cornus officinalis* – analogies and differences of two medicinal plants traditionally used.**

Frontiers in Pharmacology 2018, 9, 894 (**IF_{2017} 3,831; MNiSW – 40 pkt.**)

Mój udział polegał na przeprowadzeniu przeglądu literatury z zakresu filogenetyki, fitochemii oraz dotychczasowych badań biologicznych, przygotowaniu tekstu manuskryptu, rycin 1.-7. i tabeli 1., a także korespondencja z wydawcą. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H7. Czerwińska M.E.*, Świerczewska A., Granica S.

Bioactive constituents of *Lamium album* L. as inhibitors of cytokine secretion in human neutrophils.

Molecules 2018, 23, 2770 (**IF_{2017} 3,098; MNiSW – 30 pkt.**)

Mój udział polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej (izolacja i udział w ustaleniu struktury wyizolowanych związków, udział w przeprowadzeniu badań biologicznych wyizolowanych związków, przeprowadzenie oznaczeń, analiza statystyczna i interpretacja wyników) oraz przygotowaniu tekstu manuskryptu wraz tabelami i rycinami, a także korespondencja z wydawcą. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

Uzyskane patenty wchodzące w skład postępowania habilitacyjnego

P-H1. Czerwińska M.E.*, Kiss A.K., Naruszewicz M., Filipek A.

Oleacein for treating or preventing diseases resulting from atherosclerotic plaques.

Patent. Stany Zjednoczone, nr US 9682056 B2, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Decyzja o udzieleniu patentu z dn. 20.06.2017 r.

Mój udział polegał na opracowaniu założeń technicznych patentu oraz wykonaniu części eksperymentalnej związanej z optymalizacją procesu izolacji związku i częściowo badaniami aktywności biologicznej związku będącego podstawą osiągnięcia patentowego, zredagowanie projektu patentu i korespondencję z rzecznikiem patentowym w imieniu współtwórców. Mój udział procentowy szacuję na 25%.

P-H2. Czerwińska M.E.*, Kiss A.K., Naruszewicz M.

Zastosowanie *Ligustrum vulgare* L. do wytwarzania preparatu zawierającego oleaceinę.

Patent. Polska, nr 227843, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Decyzja o udzieleniu patentu z dn. 23.01.2018 r.

Mój udział polegał na opracowaniu założeń technicznych patentu oraz wykonaniu części eksperymentalnej związanej z optymalizacją procesu izolacji związku i badaniami aktywności biologicznej związku będących podstawą osiągnięcia patentowego, zredagowanie projektu patentu i korespondencję z rzecznikiem patentowym w imieniu współtwórców. Mój udział procentowy szacuję na 33%.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania *Impact Factor* (IF) publikacji wytypowanych do cyklu w postępowaniu habilitacyjnym wynosi 18,873, punkty MNiSW – 200.

* Autor korespondujący

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

Wprowadzenie

Substancje roślinne są uznawane za naturalne źródło związków o działaniu antyoksydacyjnym, które wzbudzają zainteresowanie ze względu na potencjalne znaczenie w prewencji i leczeniu chorób o różnej etiologii. Wiele substancji roślinnych jest podstawowym składnikiem diety, a niektóre z nich od wieków służą jako tradycyjne środki lecznicze. Niejednokrotnie związki pozyskiwane z surowców o właściwościach leczniczych znanych od czasów starożytnych stawały się prekursorem leków syntetycznych. Czołowym przykładem jest izolacja salicyny z kory wierzby białej, która pozwoliła na podjęcie prac nad syntezą kwasu acetylosalicylowego, a tym samym zapoczątkowała rozwój przemysłu farmaceutycznego. Podobnie pochodne alkaloidów charakterystyczne dla roślin z rodziny Papaveraceae, takie jak morfina, kodeina czy papaweryna, są związkami o silnym działaniu farmakologicznym szeroko wykorzystywanym w lecznictwie. Z kolei artemizynina wyizolowana z ziela bylicy rocznej do tej pory stanowi podstawę terapii skojarzonej w leczeniu malarii.

Szczególnie rozpowszechnioną grupą związków, zarówno w roślinach użytkowych jak i leczniczych są flawonoidy i kwasy fenolowe, zwyczajowo określane mianem polifenoli. Stosowanie związków polifenolowych oraz przetworów bogatych w polifenole może stanowić skuteczne wsparcie dla konwencjonalnej terapii i prewencji chorób cywilizacyjnych. Farmakoterapia tych chorób jest niezwykle trudna, gdyż ich etiologia jest złożona i wiąże się z zaburzeniami homeostazy całego organizmu. Dlatego tak istotne jest uzupełnienie konwencjonalnej farmakoterapii substancjami pochodzenia naturalnego - używanymi w życiu codziennym w postaci naparów, soków czy nalewek – lub związkami pochodzenia roślinnego. Szczególne znaczenie w aspekcie chorób cywilizacyjnych ma poszerzenie wiedzy na temat działania prozdrowotnego składników surowców roślinnych, stosowanych tradycyjnie w lecznictwie, żywieniu, ale także składników roślin użytkowych, które mogą być bogatym źródłem związków bioaktywnych. Preparaty lecznicze pochodzenia naturalnego dostępne na rynku farmaceutycznym cieszą się coraz większą popularnością wśród pacjentów, gdyż są uznawane za bezpieczne. Niemniej jednak według obecnych wymagań stawianych substancjom roślinnym stosowanym w celach farmaceutycznych lub dietetycznych konieczne jest określenie składu chemicznego oraz ich standaryzacja za pomocą zwalidowanych metod analitycznych. Dokładne badania fitochemiczne pozwalają na ocenę jakościową i ilościową związków w danej substancji roślinnej, co przekłada się na formę leku i dawkowanie gwarantującą skuteczność terapii. Ponadto prowadzenie badań biologicznych na poziomie molekularnym oraz klinicznym związków izolowanych lub preparatów zawierających związki naturalne pozwala na udokumentowanie działania farmakologicznego, skuteczności i zasadności ich stosowania (monografie farmakopealne, ESCOP, EMA). Wiele substancji roślinnych stosowanych w tradycyjnej medycynie chińskiej (TCM) zyskuje na znaczeniu w lecznictwie światowym, dlatego monografie TCM są aktualizowane i włączane do Farmakopei Europejskiej i Farmakopei Chińskiej. Surowce roślinne TCM często występują w mieszankach ziołowych, dlatego zarówno zioła jak i złożone preparaty

z nich przygotowane wymagają standaryzacji w celu zapewnienia bezpieczeństwa i skuteczności [1]. Niektóre gatunki z rodzaju *Ligustrum* oraz *Cornus* znajdują zastosowanie w mieszankach ziołowych TCM [2, 3], ale w Europie ich przedstawiciele - *Ligustrum vulgare* i *Cornus mas* - pełnią głównie rolę roślin ozdobnych lub wykorzystywanych w przemyśle spożywczym, natomiast brakuje udokumentowanych doniesień o ich potencjalnym znaczeniu terapeutycznym.

Z kolei substancje roślinne stosowane tradycyjnie lub posiadające udokumentowaną skuteczność są często uprawiane dla potrzeb przemysłu farmaceutycznego. Coraz częściej dyskutowana jest kwestia wpływu warunków uprawy na produkcję metabolitów wtórnych o działaniu farmakologicznym. Uważa się, że niektóre gatunki uprawiane w celach przemysłowych odznaczają się mniejszą zawartością związków aktywnych niż rosnące w ekosystemie naturalnym. Znaczenie pospolitych roślin leczniczych (jasnota biała, *Lamium album* L.), użytkowych (dereń jadalny, *Cornus mas* L.) lub ozdobnych (ligustr pospolity, *Ligustrum vulgare* L.) w pozyskiwaniu składników o potencjalnych właściwościach biologicznych lub farmakologicznych powinno być rozpatrzone ze względu na ich powszechne występowanie i przystosowanie do warunków klimatycznych danego rejonu geograficznego. Czynniki środowiskowe mogą bowiem wpływać na odmienny skład chemiczny tych roślin.

Spośród metod najczęściej stosowanych w analizie fitochemicznej wyróżnia się metody kolorymetryczne, spektrofotometryczne oraz chromatograficzne. Metody te wykorzystywane są do standaryzacji substancji roślinnych zgodnie w wymaganiami Farmakopei Polskiej (FP) czy Farmakopei Europejskiej (Ph. Eur.). Najszersze zastosowanie w detekcji fitochemicznej wciąż znajduje spektrofotometria. Służy ona do oznaczenia zawartości grup substancji chemicznych (sumy związków) obecnych w substancjach roślinnych oraz pozwala na identyfikację wykrywanych związków na podstawie ich zdolności do pochłaniania światła z zakresu UV-Vis. Z kolei metody chromatograficzne obejmują chromatografię cienkowarstwową, cieczową i gazową. Są one metodami separacyjnymi pozwalającymi na analizę składu substancji/przetworów roślinnych i oznaczenia ilościowe ich pojedynczych składników [4]. Zwłaszcza wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-DAD) jest obecnie najpowszechniejszą metodą wykorzystywaną w badaniach substancji pochodzenia naturalnego. W ostatnim czasie zastosowanie detekcji opartej na spektrometrii mas znacznie poszerzyło możliwości analizy fitochemicznej. Niemniej jednak wciąż konieczne jest kompleksowe łączenie tych metod w celu wyznaczenia zarówno masy analizowanych związków jak i ich parametrów chromatograficznych (czas retencji), co w konsekwencji daje ostateczne potwierdzenie ich tożsamości. Mimo intensywnego rozwoju chromatografii cieczowej, monografie farmakopealne wciąż zawierają wytyczne do wstępnego potwierdzania tożsamości substancji roślinnych za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). W związku z tym profilowanie chemiczne przy użyciu tej metody również stanowi znaczący element badań fitochemicznych, tym bardziej, że udoskonalana aparatura badawcza gwarantuje wysoką rozdzielczość, precyzję (powtarzalność i odtwarzalność) oraz dokładność. Poza tym zaletą metody TLC jest jej niski koszt i krótki czas analiz.

Niemniej ważnym aspektem badań materiału roślinnego i jego składników chemicznych pozostaje poszukiwanie ich mechanizmu działania, który może uzasadniać ich tradycyjne zastosowanie. W związku z tym w szerokim zakresie prowadzone są podstawowe badania biologiczne z użyciem metod komórkowych lub bezkomórkowych *in vitro*, a także badania farmakologiczne z użyciem modeli zwierzęcych *in vivo*. Modele wykorzystywane do oceny potencjalnej aktywności przeciwzapalnej są często stosowane w badaniach podstawowych. Podłożem wielu jednostek chorobowych (miażdżyca, cukrzyca) jest przewlekły stan zapalny związany z nadmierną aktywnością układu immunologicznego, a tym samym nadmierną produkcją markerów wydzielanych przez komórki takie jak leukocyty czy limfocyty. Neutrofile należą do grupy leukocytów obojętnochłonnych, uczestniczą w pierwszej linii obrony organizmu przed patogenami i przywracają homeostazę organizmu w miejscu uszkodzenia tkanek. W mechanizmach obronnych uczestniczą poprzez produkcję reaktywnych form tlenu (RFT), mieloperoksydazy (MPO), cytokin o znaczeniu chemotaktycznym (interleukina 8/IL-8, czynnik martwicy nowotworów α/TNF-α), białek proteolitycznych (metaloproteinaza 9/MMP-9) oraz adhezyjnych (CD11b/CD18) [78, 79, 81]. Substancje pochodzenia naturalnego przez ograniczenie wydzielania czynników prozapalnych mogą hamować nadmierną aktywność układu immunologicznego. Z praktycznego punktu widzenia istotną kwestią jest równoległe wykorzystywanie metod fitochemicznych i biologicznych w badaniach materiału roślinnego. Takie podejście jest mniej czasochłonne i pozwala na pozyskiwanie składników chemicznych o celowanym punkcie uchwytu.

Głównym celem przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego była weryfikacja następujących hipotez:

HT1. Substancje roślinne z rodzin Oleaceae, Lamiaceae i Cornaceae są źródłem związków irydoidowych, fenylopropanoidów oraz flawonoidów o znaczeniu biologicznym i terapeutycznym [**H1**–**H7**].

HT2. Sposób przygotowania wyciągów roślinnych determinuje ich skład chemiczny pod względem jakościowym i ilościowym, dzięki czemu może być podstawą ukierunkowanej izolacji związków o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym [**H1**, **H4**, **P-H1**, **P-H2**], a dodatkowo izolacja w połączeniu z badaniami biologicznymi *in vitro* ułatwia szybką i selektywną identyfikację składników o określonym punkcie uchwytu [**H3, H5**].

HT3. Tradycyjne zastosowanie substancji roślinnych bogatych w irydoidy, fenylopropanoidy oraz flawonoidy w stanach zapalnych może być wynikiem ich aktywności antyoksydacyjnej i hamującej wydzielanie mediatorów stanu zapalnego przez ludzkie neutrofile czy fibroblasty poddane działaniu ekstraktów roślinnych lub izolowanych związków [**H2**, **H3**, **H7**].

HT4. Zastosowanie substancji roślinnych z rodzaju *Ligustrum* i *Cornus* w leczeniu chorób metabolicznych w tradycyjnej medycynie chińskiej pozwala przypuszczać, że ekstrakty roślinne bogate w irydoidy, fenylopropanoidy oraz flawonoidy hamują rozwój bólu neuropatycznego towarzyszącego cukrzycy [**H4**] lub pełnią rolę inhibitorów trzustkowych enzymów trawiennych [**H5**].

Badane substancje roślinne

***Ligustrum vulgare* L.**

Spośród około 37 gatunków należących do rodzaju *Ligustrum* (oliwkowate, Oleaceae), które występują głównie w Azji, ligustr pospolity jest popularnym krzewem ozdobnym spotykanym w Europie [5, 6]. Wzmianki o jego zastosowaniu pojawiały się już przed wiekami [7-10]. Świeże liście ligustra przeżuwano w celu łagodzenia stanów zapalnych jamy ustnej i gardła lub bólu zębów oraz leczenia aft. Odwary były natomiast używane w leczeniu oparzeń i bólów głowy [11-13]. Jeszcze w drugiej połowie XX w. w niektórych regionach Eurazji przetwory z liści ligustra wciąż wykorzystywane były ze względu na właściwości przeciwzapalne, przeciwreumatyczne, moczopędne i hipotensyjne [14, 15]. W związku z tradycyjnym zastosowaniem liści ligustra jako *antiphlogisticum*, jak dotąd badania potwierdzające takie właściwości tego surowca miały na celu określenie zdolności inhibicji wybranych markerów stanu zapalnego. Wykazano, że napary z liści ligustra hamują aktywność lipooksygenazy (LOX-5) z cytozolowej frakcji płuc szczurów [16], a frakcja dichlorometanowa nawet silniej niż frakcja wodna hamuje aktywność LOX-5 oraz aktywność obu izoform cyklooksygenazy (COX-1, COX-2) [2]. Zarówno same wyciągi jak i ich składniki wykazały również wpływ hamujący na układ dopełniacza [13] oraz sekrecję markerów stanu zapalnego ludzkich neutrofili (RFT, IL-8, MMP-9, elastaza) [17]. W innym badaniu wykazano także, że poza zdolnością wymiatania wolnych rodników w warunkach *in vitro* nie wpływają toksycznie na komórki nowotworowe, m. in. HCT-116 [18, 19].

W liściach *L. vulgare* stwierdzono dotychczas obecność flawonoidów, takich jak 3-*O*-ramnoglukozyd (rutyna) i 3,7-*O*-diramnozyd kwercetyny, 7-*O*-glukozyd i 4'-*O*-glukozyd luteoliny oraz 7-*O*-glukozyd i 7-*O*-ramnoglukozyd apigeniny. Spośród pochodnych kemferolu zidentyfikowano 3-*O*-glukozyd-7-*O*-ramnozyd, 3,7-*O*-diramnozyd, 3-*O*-ramnozyd oraz 3-*O*-glukozyd (astragalina) [11, 12, 16, 20, 21]. Natomiast z grupy pochodnych kwasu cynamonowego wykryto kwas *p*-kumarowy i jego pochodne oraz fenylopropanoidy (echinakozyd, werbaskozyd/akteozyd) [17, 21]. Jednak najliczniejszą grupę (76% sumy związków fenolowych) stanowią glikozydy irydoidowe, w szczególności sekoirydoidy, w postaci estrów i glikozydów tyrozolu (*p*-hydroksyfenyloetanol - - *p*-HPEA) oraz hydroksytyrozolu (3,4-dihydroksyfenyloetanol - 3,4-DHPEA). Należą do nich oleuropeina, ligstrozyd, ligustalozyd A i B [11, 17, 21]. Ponadto w wyciągu wodnym stwierdzono obecność aglikonów sekoirydoidów, tj. oleaceiny (3,4-DHPEA-EDA, dialdehydowa pochodna kwasu elenolowego związana z hydroksytyrozolem) i oleokantalu (*p*-HPEA-EDA) oraz monoaldehydowej formy aglikonu ligstrozydu (*p*-HPEA-EA) [17, 22]. Pochodne te są także składnikami frakcji fenolowej oleju z oliwek (*Olea europaea* L., Oleaceae) i przypisuje się im rolę składników diety odpowiedzialnych za korzystny wpływ na układ sercowo-naczyniowy obserwowany w populacjach rejonu Morza Śródziemnego [74]. W badaniach *in vitro* wykazano, że oleaceina jest inhibitorem konwertazy angiotensynowej (ACE) oraz obojętnej endopeptydazy (NEP) [22, 23].

***Lamium album* L.**

Jasnota biała (jasnotowate, Lamiaceae) jest byliną powszechnie spotykaną w Europie, Azji oraz północnej Afryce. W medycynie ludowej kwiaty jasnoty były stosowane w stanach zapalnych błon śluzowych jamy ustnej i gardła, kaszlu, a także jako środek przeciwskurczowy, ściągający i przeciwbakteryjny [24, 25]. Jak dotąd stwierdzono, że wyciągi z kwiatów lub nadziemnych części jasnoty wymiatają sztuczny rodnik 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylowy (DPPH), anion ponadtlenkowy ($\cdot O_2^-$) i hamują aktywność LOX-5 [26, 27], a także stymulują proliferację fibroblastów [28]. Z kolei ekstrakty chloroformowe hamują replikację wirusa opryszczki typu 1 i 2 [29].

W rodzaju *Lamium* stwierdzono obecność glikozydów irydoidowych, które uznano za potencjalne markery chemotaksonomiczne i filogenetyczne tego rodzaju. W zielu jasnoty białej szczególnie charakterystycznymi glikozydami irydoidowymi są lamalbid oraz karioptozyd, w mniejszym stopniu ester metylowy szanzysydu i barleryna [30, 31]. Dodatkowo w *L. album* stwierdzono obecność innych irydoidów – albozydu A i B [32]. Ponadto występują estry fenylopropanoidowe, flawonoidy, kwasy fenolowe. Lamalbozyd (lamiuzyd A, teupoliozyd) i werbaskozyd są opisane jako główne glikozydy fenylopropanoidowe w tym gatunku [33]. Zarówno fenylopropanoidy jak i kwas 5-kawoilochinowy (kwas chlorogenowy) są typowe dla rodziny Lamiaceae, przy czym lamalbozyd został uznany za najbardziej charakterystyczny dla *L. album*. Spośród flawonoidów zidentyfikowano pochodne kwercetyny (rutyna, 3-*O*-glukozyd kwercetyny - izokwercytryna), pochodne kemferolu (astragalina, tylirozyd), pochodne luteoliny (7-*O*-glukozyd luteoliny), apigeniny (7-*O*-glukozyd apigeniny, 7-*O*-ramnoglukozyd apigeniny) oraz naryngeniny (7-*O*-ramnoglukozyd naryngeniny) [33, 34]. Opisano również pochodne izoskutelaryny (7-*O*-allozylo(1→2)glukozyd izoskutelaryny, izomery 7-*O*-(6-*O*-acetyloallozylo)(1→6)glukozydu izoskutelaryny, 7-*O*-(6-*O*-acetyloallozylo)(1→2)glukozydu izoskutelaryny, 7-*O*-(6-*O*-allozylo)(1→2)glukozyd 4'-*O*-metyloizoskutelaryny, 7-*O*-(6-*O*-acetyloallozylo)(1→2)glukozyd 4'-*O*-metyloizoskutelaryny) [34]. Rzadziej wykrywane były natomiast ekdysteroidy oraz terpeny [25]. Opisane w tym gatunku ekdysteroidy to abutasteron, inkosteron, polipodyna B, pterosteron [35]. Poza tym stwierdzono obecność glukozydu hemiterpenowego – hemialbozydu – oraz 9-*O*-β-D-glukopiranozyloksy-5-megastigmen-4-onu [36, 37].

***Cornus mas* L. *i Cornus alba* L.**

Klasyfikacja i podział chemotaksonomiczny oraz powiązania filogenetyczne w obrębie rodzaju *Cornus* (dereniowate, Cornaceae) są skomplikowane ze względu na morfologiczną różnorodność kwiatów i owoców tych roślin, a także różnice chromosomalne genów (m. in. *rbcL*, *matK*) w DNA chloroplastów lub jądrowym DNA [38-41]. W celu ułatwienia identyfikacji gatunków na podstawie cech morfologicznych wyznaczono 4 grupy dereni: gatunki o białych lub niebieskich owocach, derenie właściwe, gatunki charakteryzujące się małymi przylistkami oraz gatunki z charakterystycznymi dużymi przylistkami [42, 43]. Spośród 65 gatunków rodzaju *Cornus*, dereń jadalny (*Cornus mas* L.) oraz dereń lekarski (*Cornus officinalis* Sieb et Zucc.), były najczęściej stosowane w medycynie tradycyjnej. Dereń jadalny występuje w środkowej i południowo-wschodniej Europie, rzadziej w południowej czy zachodniej Azji [44]. Z kolei dereń lekarski, zwany

też azjatyckim, jest krzewem rozpowszechnionym w Azji (Chiny, Korea, Japonia), a jego przodkiem i filogenetycznie siostrzanym gatunkiem jest dereń jadalny, zawleczony do Azji z terenów Polski, Francji, Niemiec i Holandii [41]. Oba gatunki należą do grupy dereni właściwych i wykazują wyraźne podobieństwa morfologiczne w budowie kwiatów oraz barwie owoców. W medycynie ludowej owoce derenia jadalnego wykorzystywano w leczeniu gorączki, anemii, zapalenia jelit lub biegunki [45]. Obecnie poleca się go osobom z przeziębieniem, słabą przemianą materii, nadwagą, hemoroidami i dolegliwościami żołądkowymi. W Europie dereń jadalny jest stosowany głównie w celach spożywczych do produkcji dżemów, nalewek czy soków [46, 47]. Natomiast dereń azjatycki, znany jako „*Shanzhuyu*" wchodzi w skład złożonych preparatów stosowanych w TCM [3, 48]. Owocom obu gatunków przypisuje się potencjalne właściwości hipoglikemizujące i regulujące stężenie lipidów [49-53]. Za efekt ten mogą być odpowiedzialne składniki tych owoców, w szczególności należące do grupy garbników, irydoidów, antocyjanów i flawonoidów [46, 54-57]. Jak dotąd w owocach derenia jadalnego opisano antocyjany (3-*O*-galaktozyd i 3-*O*-robinobiozyd cyjanidyny, 3-*O*-glukozyd, 3-*O*-ramnoglukozyd, 3-*O*-galaktozyd pelargonidyny, 3-*O*-galaktozyd delfinidyny) oraz flawonoidy, takie jak glikozydy kwercetyny (izokwercytryna, 3-*O*-galaktozyd kwercetyny - hiperozyd, 3-*O*-glukuronid kwercetyny - kwercyturon, rutyna, 3-*O*-ksylozyd kwercetyny, 3-*O*-ramnozyd kwercetyny - kwercytryna), kemferolu (3-*O*-galaktozyd kemferolu - trifolina) i aromadendryny (7-*O*-glukozyd aromadendryny) [46, 57]. Natomiast głównymi przedstawicielami związków irydoidowych w owocach i ekstraktach z owoców derenia jadalnego są kwas loganowy i kornuzyd [46]. W dotychczasowych badaniach wykryto pochodne garbników hydrolizujących (mono-, di-, tri- i tetragalusany glukozy, digalusan HHDP-glukozy) [58].

Mniej znanym gatunkiem, który zaliczany jest do grupy dereni o białych owocach, jest dereń biały (*Cornus alba* L.), zwany też syberyjskim. Jest uprawiany przede wszystkim jako mało wymagająca roślina ozdobna na terenach przemysłowych na całym świecie. Tylko jedno doniesienie wspomina o właściwościach przeciwzapalnych, hemostatycznych i moczopędnych derenia białego, wykorzystywanych w TCM. Jego łodygi i liście są polecane w leczeniu przeziębień, otyłości, stanach zapalnych dróg moczowych czy biegunce. Dotychczas z gatunku tego wyizolowano i zidentyfikowano 12 związków. Należą do nich kwercyturon, izokwercytryna i trifolina oraz garbniki hydrolizujące, takie jak 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoiloglukoza (PGG) oraz kornuzyny A i B [59]. W jedynym znanym badaniu określono aktywność antyoksydacyjną oraz antyproliferacyjną wspomnianych związków na modelu linii komórkowych prostaty LNCaP i DU145 [59].

Weryfikacja hipotezy HT1

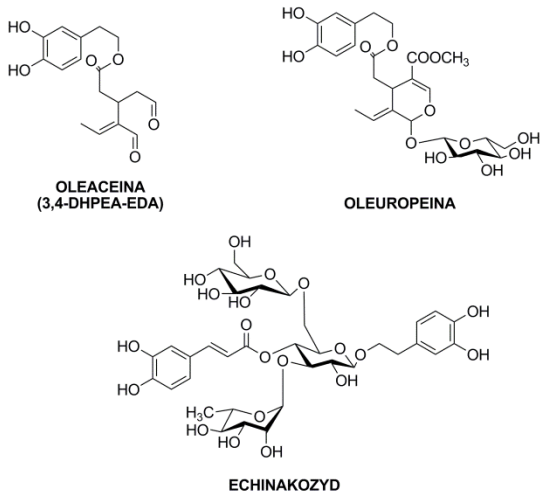
Substancje roślinne z rodzin Oleaceae, Lamiaceae i Cornaceae są źródłem związków irydoidowych, fenylopropanoidów oraz flawonoidów o znaczeniu biologicznym i terapeutycznym [**H1**-**H7**].

Metabolity wtórne roślin wyższych są często markerami chemotaksonomicznymi, które ułatwiają niekiedy skomplikowaną klasyfikację roślin. O ile flawonoidy występują powszechnie niemalże we wszystkich roślinach, o tyle irydoidy czy fenylopropanoidy są produktami metabolizmu tylko

niektórych. Irydoidy spotykane są przede wszystkim w roślinach należących do Lamiales, Gentianales, Scrophulariales, Dipsacales oraz Ericales [4, 60]. Ich znaczenie chemotaksonomiczne było szczególnie rozpatrywane w rodzajach *Lamium* i *Plantago*, a także w rodzinie Oleaceae [4, 61]. W przypadku rodzaju *Cornus* jednoznaczna klasyfikacja chemotaksonomiczna jest skomplikowana. W zależności od grupy w obrębie tego taksonu głównymi metabolitami wtórnymi są glikozydy irydoidowe wywodzące się z kwasu mewalonowego lub glikozydy fenolowe, takie jak salidrozyd powstałe w szlaku kwasu szikimowego. W czerwono owocujących gatunkach derenia glikozydy irydoidowe stanowią dominującą grupę związków, a jednocześnie cechę symplezjomorficzną [62, 63]. Pod względem struktury irydoidy są monoterpenoidami, pochodnymi cyklopentano[c]piranu, a biogenetycznie i chemotaksonomicznie stanowią struktury pośrednie między terpenami i alkaloidami. Zwykle posiadają strukturę bicykliczną H-5/H-9β [60, 64]. Najczęściej występują w formie glikozydów, w których anomeryczny atom węgla D-glukozy tworzy wiązanie glikozydowe z grupą hydroksylową w pozycji C_1 szkieletu iridanu. Niemniej jednak są także spotykane w formie aglikonów, dimerów i innych pochodnych [65]. Z kolei sekoirydoidy są pochodnymi irydoidowymi charakteryzującymi się rozerwanym wiązaniem C_7 – C_8 w pierścieniu cyklopentanu. Irydoidy występują w roślinach leczniczych tradycyjnie stosowanych jako substancje goryczowe, uspokajające, moczopędne, przeciwkaszlowe, środki na rany i choroby skóry oraz w leczeniu otyłości, padaczki, cukrzycy czy hiperlipidemii [65-67]. Z kolei fenylopropanoidy należą do jednych z najczęściej występujących w roślinach metabolitów wtórnych. Szlak kwasu szikimowego stanowi pierwszy etap ich biosyntezy, w którym uczestniczą fenyloalanina i/lub tyrozyna. Za pośrednictwem liaz aminokwasów aromatycznych powstaje kwas cynamonowy [60, 68]. Fenylopropanoidy zwykle zawierają jeden lub kilka fragmentów C_6 – C_3. Z powodu znacznej różnorodności ich struktur do grupy fenylopropanoidów zaliczane są formy proste (pochodne alkoholu cynamonowego, kwasu cynamonowego i fenylopropanu) oraz złożone (glikozydy fenylopropanoidowe z cząsteczką fenyloetanu, lignoidy) [69]. Do grupy kwasu cynamonowego należą kwas *p*-kumarowy, kawowy czy ferulowy [60]. Jednak w przyrodzie rzadko występują w postaci wolnej, natomiast częściej są spotykane w formie estrów poprzez wiązanie z grupami hydroksylowymi cukrów. Estry fenylopropanoidowe zawierające dwie lub trzy cząsteczki cukru związane z cząsteczką dihydroksyfenyloetanolu są spotykane szczególnie w roślinach należących do Lamiales i Oleales [60].

Celem prac było zatem poznanie składu chemicznego wyciągów przygotowanych z wybranych gatunków roślin z rodzin Oleaceae, Lamiaceae i Cornaceae. Założeniem prac było scharakteryzowanie pod względem fitochemicznym wyciągów, których aktywność biologiczna była badana na modelach komórkowych i bezkomórkowych *in vitro* oraz modelu zwierzęcym *in vivo*. Ze względu na przesłanki literaturowe o występowaniu irydoidów, fenylopropanoidów, a także flawonoidów w wybranych substancjach roślinnych, stały się one głównym celem poszukiwań. W związku z tym za pomocą metody HPLC-DAD-MS^n przeprowadzono analizę jakościową wszystkich ekstraktów. Dodatkowo do analizy wyciągu wodnego z liści ligustra pospolitego wykorzystano metodę HPTLC.

Analiza fitochemiczna wykazała, że dominującymi składnikami ekstraktu wodnego z liści ligustra są sekoirydoidy oraz fenylopropanoidy. Zidentyfikowane sekoirydoidy występowały w formie glikozydów lub aglikonów. Najwyższe piki przy długości fali λ = 240 nm zostały przypisane oleuropeinie oraz jej pochodnej oleaceinie. Głównym fenylopropanoidem zarejestrowanym na chromatogramie przy długości fali λ = 325 nm był echinakozyd [**H1**, **H2, H4**]. Struktury tych związków przedstawiłam na rycinie 1.



Rycina 1. Struktury związków zidentyfikowanych w ekstraktach z liści ligustra pospolitego.

Irydoidy są uznawane za markery chemotaksonomiczne rodziny Oleaceae [61]. Ligustr pospolity występuje jednak w innych rejonach geograficznych niż oliwka europejska (*Olea europea* L.). W wyciągach przygotowanych z liści obu gatunków potwierdzono, że irydoidy należące do grupy sekoirydoidów są związkami dominującymi. Spośród zidentyfikowanych związków sekoirydoidowych można wymienić oleozyd, 11-metyloester oleozydu, 10-hydroksyoleuropeinę, oleaceinę, oleuropeinę oraz ligstrozyd. Oleokantal, będący dialdehydowym aglikonem ligstrozydu, wykryto jedynie w wyciągu wodnym z liści ligustra. W ekstraktach z liści oliwki i ligustra zidentyfikowano ponadto flawonoidy, takie jak 7-*O*-glukozyd luteoliny i rutyna, a także fenylopropanoid – werbaskozyd. Natomiast jedynie w ekstraktach z liści oliwki zidentyfikowano lignany – oliwil i glukozyd oliwilu. Podczas porównawczej analizy składu chemicznego wyciągów wodnych i etanolowych z liści ligustra pospolitego i oliwki europejskiej stwierdzono, że wyciągi z liści ligustra charakteryzują się większą różnorodnością fitochemiczną niż wyciągi z liści oliwki. W przeciwieństwie do przetworów oliwkowych, w wyciągach z liści ligustra wykryto echinakozyd i ligustroflawon, a dodatkowo z grupy sekoirydoidów - ligustalozyd A. Ponadto na podstawie danych UV-Vis oraz MS/MS ustalono, że w przetworach z ligustra występują glukuronidy kwasu *p*-kumaroilowego oraz inne pochodne kwasu *p*-kumaroilo- i feruloilochinowego, których nie zidentyfikowano w wyciągach z liści oliwki [**H2**]. Prowadząc analizę porównawczą obu spokrewnionych ze sobą gatunków z rodziny Oleaceae, w wyciągach z liści oznaczono także ilościowo całkowitą zawartość związków fenolowych i flawonoidowych [**H2**]. Wyciągi etanolowe zawierały znacznie więcej związków fenolowych i flawonoidowych niż wyciągi wodne, przy czym ekstrakty wodne z liści oliwki odznaczały się wyższą zawartością polifenoli w przeliczeniu na kwas galusowy (84,3 ± 5,2 mg GAE/g) w porównaniu

z wyciagami wodnymi z liści ligustra (75,8 ± 4,2 mg GAE/g). Z kolei wyższą zawartość flawonoidów oznaczono w wyciągach z liści ligustra. Całkowita zawartość flawonoidów w wyciągu wodnym z liści ligustra w przeliczeniu na kwercetynę wyniosła 2,6 ± 0,1 mg QE/g, a w wyciągu wodnym z liści oliwki 1,2 ± 0,1 mg QE/g [**H2**].

Z kolei w wyciągach etanolowych z ziela i kwiatów jasnoty białej z rodziny Lamiaceae zidentyfikowano 8 fenylopropanoidów, 3 irydoidy, 7 kwasów fenolowych oraz 6 flawonoidów. Dominującymi związkami były lamalbid (lamirydozyd), kwas chlorogenowy, lamiuzyd A (lamalbozyd, teupoliozyd) oraz ramnoheksozyd kwercetyny. W obu substancjach roślinnych zarejestrowano również piki lamiuzydu B, lamiuzydu C i tylirozydu. Natomiast w wyciagach z ziela jasnoty występowały izomery kwasu chlorogenowego, których obecności nie stwierdzono w ekstraktach z kwiatów. Z drugiej strony, glikozyd kwercetyny o masie *m/z* 463 $[M-H]^-$ wykryto jedynie w wyciągu z kwiatów. Na chromatogramie HPLC ekstraktu z kwiatów zarejestrowano wyższe piki niektórych fenylopropanoidów (werbaskozyd) oraz malonyloheksozydu kwercetyny w porównaniu z ekstraktami z ziela [**H3**]. Ze względu na nieznaczne różnice składu chemicznego obu substancji roślinnych do izolacji związków wykorzystano nadziemne części jasnoty. W efekcie po raz pierwszy wyizolowano i zidentyfikowano w tym gatunku fenylopropanoidy – lamiuzyd B, lamiuzyd C i 6"-*O*-glukopiranozylomartynozyd (*trans*-lamiuzyd E) oraz flinozyd D. Warto podkreślić, że lamiuzydy B, C i E wcześniej wyizolowano i zidentyfikowano jedynie w zielu jasnoty purpurowej [70]. Porównując widma NMR lamiuzydu E opisane przez Ito i wsp. (*2006*), stwierdzono, że geometria olefiny w podstawniku feruloilowym występuje w formie *trans* w strukturze 6"-*O*-glukopiranozylomartynozydu. Z tego powodu zaproponowano jako nazwę glukomartynozyd lub *trans*-lamiuzyd E dla tego izomeru. Pochodne kwercetyny, takie jak 3-*O*-(4"'-*O*-*E*-feruloilo)ramnoglukozyd kwercetyny oraz 3-*O*-ramnozylo-(4""-*O*-*E*-feruloilo)ramnoglukozyd kwercetyny zostały zidentyfikowane jako struktury dotychczas nieopisane w literaturze [**H7**]. Z prac tych można wywnioskować, że w badanym gatunku grupa fenylopropanoidów wyróżnia się znaczną różnorodnością w przeciwieństwie do ligustra pospolitego, gdzie dominowały przede wszystkim związki sekoirydoidowe. Z drugiej strony obecność znacznych ilości irydoidów pozwala potwierdzić ich znaczenie chemotaksonomiczne w gatunkach z rodzin Lamiaceae i Oleaceae.

Podobnie jak w liściach ligustra czy zielu jasnoty białej, w owocach derenia jadalnego dominującymi składnikami są irydoidy, w szczególności kwas loganowy. Znacznie mniejszy pik zarejestrowano w przypadku kornuzydu. Ponadto charakterystyczną dla derenia jadalnego grupą związków są antocyjany. W badanym materiale roślinnym zidentyfikowano 3-*O*-galaktozyd i 3-*O*-robinobiozyd pelargonidyny, a także 3-*O*-galaktozyd cyjanidyny. W trakcie analizy HPLC-DAD-MS/MS zarejestrowano kilka sygnałów, które przypisano pochodnym garbników hydrolizujących (di- i tetragaloiloglukoza, digaloilo-HHDP-glukoza) [**H5**]. Niemniej jednak z przeglądu dotychczasowej literatury wynika, że występowanie garbników hydrolizujących w owocach derenia jadalnego jest słabo opisane w przeciwieństwie do derenia lekarskiego [**H6**]. W pracy przeglądowej **H6** szczegółowo opisano podobieństwa i różnice w składzie chemicznym tych dwóch gatunków. W pracy **H5** porównano natomiast skład chemiczny wyciągów z owoców derenia jadalnego oraz białego.

Oba gatunki są powszechnie spotykane w rodzimej florze Polski. W wyciągach z owoców derenia białego charakterystyczną grupą związków były flawonoidy, których nie wykryto w wyciągach z owoców derenia jadalnego. Zidentyfikowano glikozydy kwercetyny: hiperozyd, izokwercytrynę, kwercyturon, 3-*O*-ksylozyd kwercetyny i 3-*O*-(6"-malonylo)-glukozyd kwercetyny, a także pochodne kemferolu: 3-*O*-glukozyd i 3-*O*-glukuronid kemferolu. Na podstawie analizy widm UV/Vis, w owocach derenia białego stwierdzono także obecność irydoidów. Jednak ich pełna identyfikacja nie była możliwa. Nie stwierdzono natomiast obecności kwasu loganowego czy kornuzydu, a w żadnym badanym gatunku nie występowały fenylopropanoidy [**H5**]. Biorąc pod uwagę tak odmienny skład obu gatunków, potwierdzono brak powiązań filogenetycznych, jakie są z kolei widoczne w przypadku siostrzanych gatunków – derenia jadalnego i lekarskiego. Z drugiej strony przeprowadzone jednocześnie badania biologiczne ekstraktów pozwoliły na identyfikację grupy związków odpowiedzialnych za obserwowaną bioaktywność.

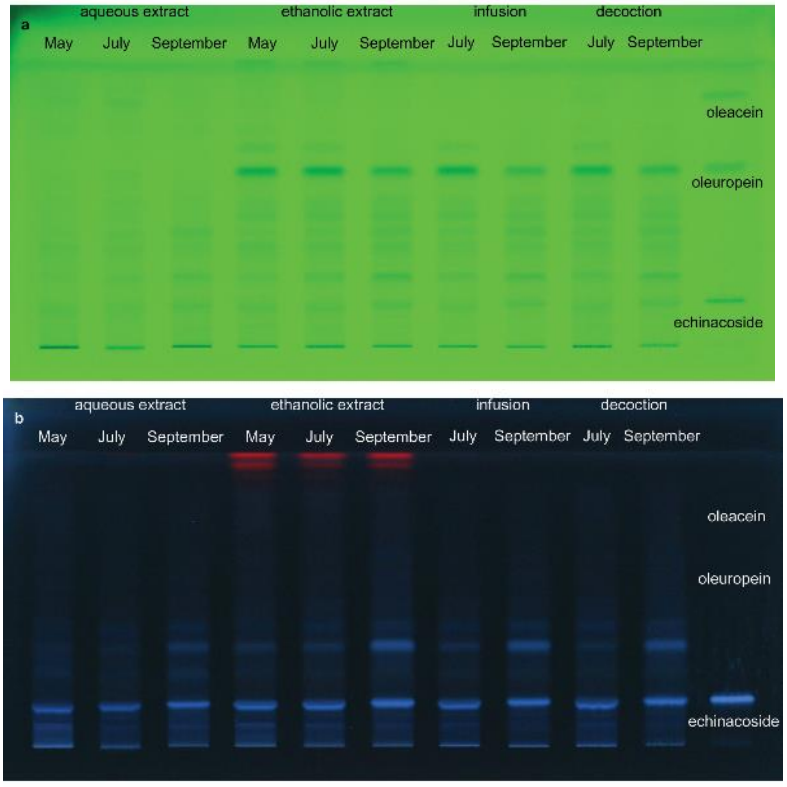
Weryfikacja hipotezy HT2

Sposób przygotowania wyciągów roślinnych determinuje ich skład chemiczny pod względem jakościowym i ilościowym, dzięki czemu może być podstawą ukierunkowanej izolacji związków o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym [**H1**, **H4**, **P-H1**, **P-H2**], a dodatkowo izolacja w połączeniu z badaniami biologicznymi *in vitro* ułatwia szybką i selektywną identyfikację składników o określonym punkcie uchwytu [**H3, H5**].

W oznaczeniach ilościowych glikozydów irydoidowych do ekstrakcji stosuje się wrzącą wodę oraz warunki zasadowe, które mają zapobiegać hydrolizie kwaśnej i enzymatycznej form glikozydowych [71]. Przykładem glikozydu irydoidowego jest oleuropeina, która z kolei ulega degradacji do innych pochodnych w czasie dojrzewania owoców i liści oliwki europejskiej. Z dotychczasowych doniesień literaturowych wynika, że warunki uprawy oraz czynniki środowiskowe istotnie wpływają na stężenie składników chemicznych w pozyskiwanych z oliwki substancjach roślinnych [72-74]. Wcześniejsze badania wskazywały natomiast, że sekoirydoidy i fenylopropanoidy prawdopodobnie odpowiadają za właściwości biologiczne liści ligustra pospolitego [13, 16, 17, 21]. Niemniej jednak brakowało informacji na temat zawartości tych składników oraz metod, które mogłyby służyć do oznaczania ilościowego głównych składników w tym materiale roślinnym. Uwzględniając konieczność standaryzacji substancji roślinnych, przeprowadzono walidację dwóch metod analitycznych - densytometrycznej po rozdziale HPTLC oraz metody HPLC – oznaczania zawartości charakterystycznych związków w przetworach z liści ligustra pospolitego.

Najczęściej stosowanymi w medycynie ludowej przetworami roślinnymi są napary, odwary lub nalewki. Dlatego do przeprowadzenia badań przygotowywano wyciągi z użyciem rozpuszczalników takich jak woda, etanol lub ich mieszaniny. Biorąc pod uwagę zmienną zawartość metabolitów wtórnych w roślinach w zależności od okresu wegetacji oraz ograniczoną trwałość niektórych z nich wprowadzono dodatkowe zmienne – zbiór surowca w różnym czasie (co miesiąc od maja do września) oraz różną temperaturę przygotowania ekstraktów [**H1**]. Liście ligustra

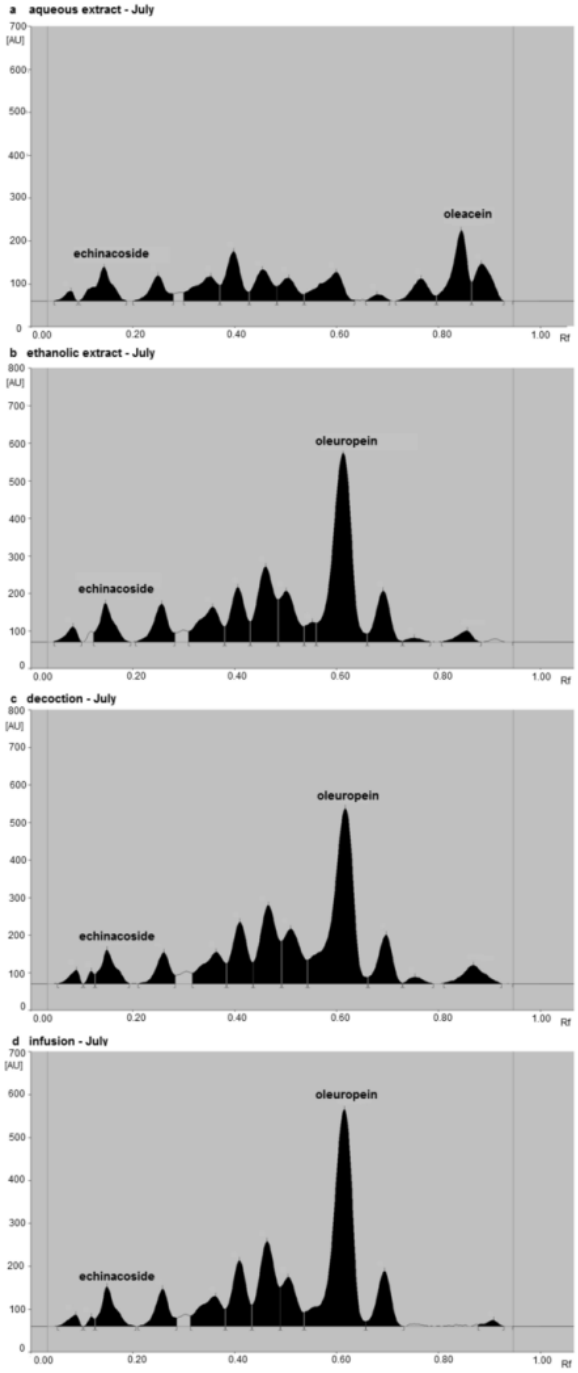
do analiz ilościowych zostały zebrane przed okresem kwitnienia (maj), w okresie kwitnienia (czerwiec – sierpień) oraz po zakończeniu kwitnienia (wrzesień). Stosując zmienne parametry ekstrakcji przygotowano wyciągi wodne w temperaturze pokojowej, napary, odwary oraz wyciągi etanolowe. W celu sporządzenia wyciągów wodnych liście poddano procesowi maceracji wodą (w stosunku 1 cz. substancji roślinnej: 10 cz. wody) przez godzinę w temperaturze pokojowej. Natomiast napary uzyskano przeprowadzając ekstrakcję liści wrzącą wodą (w stosunku 1cz. substancji roślinnej: 40 cz. wrzącej wody) pod przykryciem. Odwary (w stosunku 1cz. substancji roślinnej: 40 cz. wody) i wyciągi etanolowe (w stosunku 1 cz. substancji roślinnej: 10 cz. etanolu 60%, v/v) przygotowano, ogrzewając je pod chłodnicą zwrotną w temperaturze około 95°C. Celem badania było opracowanie i walidacja metody densytometrycznej po rozdziale związków techniką wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej. Metoda ta została wykorzystana do oznaczenia ilościowego związków z grup sekoirydoidów (oleaceiny, oleuropeiny) oraz fenylopropanoidów (echinakozydu) [**H1**]. Pierwotną fazą wykorzystaną do rozdziału tych związków była mieszanina dichlorometan:metanol:woda (85:15:1,5; v/v/v) opisana w monografii *Oleae folium* (FP IX, 2011). W wyniku modyfikacji zastosowanie ostatecznej fazy ruchomej dichlorometan:metanol:kwas mrówkowy:woda (80:25:4:1,5; v/v/v/v) pozwoliło na optymalny rozdział oznaczanych związków (Rycina 2). Zastosowanie kwasu mrówkowego zapewniło zmniejszenie rozmycia plam.



Rycina 2. Chromatogramy HPTLC wyciągów z liści ligustra zebranych w maju, lipcu lub we wrześniu przy długości fali λ = 240 nm (a) i λ = 325 nm (b) [**H1**].

Opracowana metoda jest specyficzna, dokładna i precyzyjna. Krzywe kalibracyjne wyznaczono stosując substancje wzorcowe, takie jak oleaceina, oleuropeina i echinakozyd. Oleaceinę

i oleuropeinę wyizolowano z liści ligustra pospolitego, a echinakozyd został zakupiony. Warto przy tym zaznaczyć, że oleaceina nie jest substancją komercyjnie dostępną.



Rycina 3. Densytogramy HPTLC przygotowane z liści ligustra zebranych w lipcu uzyskane przy długości fali λ =240 nm [**H1**].

Przeprowadzona analiza ilościowa składników substancji roślinnej w zależności od czasu zbioru pozwoliła ustalić, która pora roku sprzyja pozyskiwaniu surowca roślinnego o największej zawartości związków biologicznie aktywnych w celu zwiększenia wydajności procesu ich izolacji. Na podstawie chromatogramów HPTLC (Rycina 2.) ustaliłam, że echinakozyd (R_f = 0,12 ± 0,01) występuje we wszystkich przygotowanych wyciągach bez względu na rodzaj użytego rozpuszczalnika

oraz zastosowaną podczas ekstrakcji temperaturę. Plamy oleuropeiny (R_f = 0,58 ± 0,03) wykryto w wyciągu etanolowym, naparze i odwarze, ale nie stwierdzono jej obecności w wyciągach wodnych. Z kolei we wszystkich wyciągach wodnych przygotowanych w temperaturze pokojowej stwierdzono obecność oleaceiny (R_f = 0,82 ± 0,01). Sekoirydoidy są uważane za związki chemicznie labilne. Ponadto zawartość aglikonów sekoirydoidowych i ich glikozydów ulega zmianie podczas procesu ekstrakcji z powodu wzrastającej aktywności endogennych enzymów, takich jak β-glukozydaza czy metyloesteraza, występujących w substancjach pochodzenia roślinnego. W związku z tym zarówno rozpuszczalniki organiczne (etanol) jak i wysoka temperatura przyczyniają się do ich dezaktywacji (denaturacja). Z tego powodu wyciągi wodne przygotowane w temperaturze pokojowej zawierają wysokie stężenia aglikonów, a niskie stężenia glikozydów. Dlatego nie stwierdzono obecności oleaceiny w wyciągach etanolowych oraz odwarach i naparach przygotowanych w wysokiej temperaturze (Rycina 3). Zawartość oleaceiny oznaczono ilościowo jedynie w wyciągach wodnych, podczas gdy oleuropeinę – w pozostałych wyciągach [**H1**].

Wraz z rozwojem wegetacyjnym ligustra stężenie echinakozydu stopniowo wzrastało osiągając maksimum po zakończeniu okresu kwitnienia (0,59 ± 0,02% w wyciągu etanolowym, 0,54 ± 0,01% w odwarze). Natomiast stężenia oleaceiny i oleuropeiny były zmienne osiągając najwyższą wartość w okresie kwitnienia. Zawartość oleuropeiny była porównywalnie wysoka we wszystkich badanych ekstraktach przygotowanych z liści zebranych w lipcu (napar 2,72 ± 0,14%; wyciąg etanolowy 2,57 ± 0,25%; odwar 2,19 ± 0,11%). Najwyższe stężenie oleaceiny odnotowano w wyciągu wodnym z liści zebranych w czerwcu (0,79 ± 0,06%). Na podstawie tych danych, wywnioskowano, że w celu efektywnej izolacji sekoirydoidów z liści ligustra zbiory surowca w Polsce powinny odbywać się w czerwcu lub lipcu, a echinakozydu – we wrześniu [**H1**].

Metodę densytometryczną po rozdziale związków techniką HPTLC opracowaną w pracy **H1** wykorzystano do oznaczenia ilościowego oleuropeiny w wyciągach z liści oliwki i ligustra w celu porównania jej zawartości. Wyciągi etanolowe z oliwki charakteryzowały się wyższą zawartością oleuropeiny w porównaniu z wyciągiem etanolowym z liści ligustra. Zgodnie z monografią *Oleae folii extractum siccum* (Ph. Eur. 8.0, FPX) zawartość oleuropeiny w wyciągu nie powinna być mniejsza niż 16%. W przeciwieństwie do liści ligustra oznaczono zawartość oleuropeiny w wyciągu wodnym z liści oliwki [**H2**].

Analizę ilościową wyznaczonych markerów fitochemicznych, w wyciągu wodnym z liści ligustra przeprowadzono także za pomocą metody HPLC-DAD. Celem tej pracy było scharakteryzowanie pod względem jakościowym i ilościowym testowanego w warunkach *in vivo* wyciągu. Wyznaczenie profilu fitochemicznego wyciągu aplikowanego zwierzętom pozwoliło na wstępne przypisanie aktywności farmakologicznej związkom o najwyższym stężeniu [**H4**]. Opracowanie i walidacja metody HPLC-DAD pozwoliła na określenie zawartości wybranych markerów z grup sekoirydoidów i fenylopropanoidów. Podobnie jak w przypadku odczytu densytometrycznego po rozdziale techniką HPTLC, metoda HPLC-DAD spełniła wymagania pod względem specyficzności, dokładności i precyzji. Krzywe kalibracyjne wyznaczono stosując substancje wzorcowe: oleaceinę, oleuropeinę, oleokantal, echinakozyd i werbaskozyd. W wyciągu wodnym potwierdzono najwyższą zawartość oleaceiny

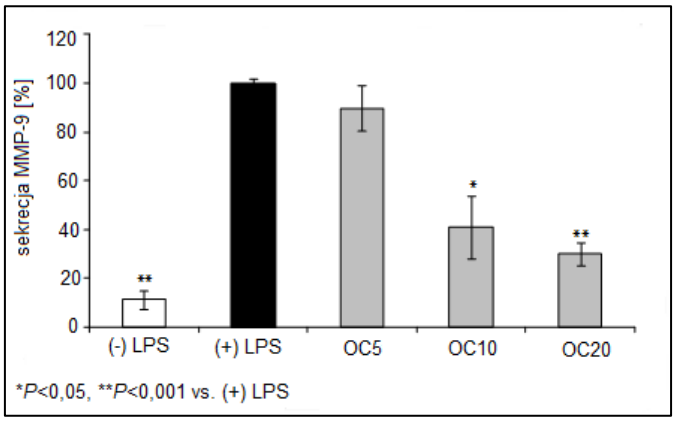
(23,48 ± 0,87 mg/g wyciągu) spośród wszystkich oznaczanych związków. Wyższa zawartość oleaceiny oznaczona metodą HPLC może wynikać z większej czułości tej metody oraz różnic miejsca i czasu zbioru substancji roślinnej. W przeciwieństwie do metody densytometrycznej (HPTLC), udało się zidentyfikować i oznaczyć zawartość oleuropeiny. Jednak zawartość oleuropeiny (1,50 ± 0,01 mg/g wyciągu) była najniższa w porównaniu z innymi markerami. Zawartość oleokantalu, echinakozydu i werbaskozydu wyniosły odpowiednio 8,44 ± 0,08 mg/g, 6,46 ± 0,07 mg/g oraz 4,03 ± 0,04 mg/g wyciągu [**H4**].

Z kolei opracowanie ukierunkowanej metody izolacji oleaceiny z liści ligustra pospolitego stało się podstawą zastrzeżeń patentowych na terenie Polski i Stanów Zjednoczonych [**P-H1**, **P-H2**]. Izolacji oleaceiny obecnej w liściach ligustra dokonano wg zmodyfikowanej metody opracowanej w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego [22]. W pierwszym etapie liście ligustra poddano ekstrakcji wodą w łaźni ultradźwiękowej (w stosunku 1 cz. substancji roślinnej: 10 cz. wody). W celu uzyskania mniej zanieczyszczonego wyciągu oraz zwiększenia wydajności procesu izolacji pożądanego związku użyto eteru dietylowego zamiast octanu etylu. Wcześniejsze analizy wykazały bowiem, że frakcja octanu etylu zawiera więcej związków chemicznych, co tym samym utrudnia proces izolacji oleaceiny. W zmodyfikowanej metodzie frakcję eterową poddawano rozdziałowi przy użyciu chromatografii typu Flash na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym (PF-30 SIHP/80G PuriFlash) przy użyciu mieszaniny chloroformu i octanu etylu (85:15) w układzie izokratycznym. Wybrane frakcje poddano dalszemu rozdziałowi na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym (PF-30 SIHP/80G PuriFlash) przy użyciu mieszaniny toluenu, octanu metylu i metanolu (84:11:5) w układzie izokratycznym. Jedną z uzyskanych frakcji naniesiono na kolumnę wypełnioną złożem Sephadex-LH20 i po rozdziale przy użyciu mieszaniny chloroformu i metanolu (9:1) wyizolowano oleaceinę. Uzyskano około 1,3 g związku, czym znacząco podwyższono wydajność procesu izolacji w porównaniu z pierwotną metodą. Tożsamość związku potwierdzono metodami NMR oraz HPLC-DAD-MS/MS. W tabeli 1. przedstawiono modyfikacje metody izolacji oleaceiny zastosowane w celu zwiększenia wydajności tego procesu. Pozyskanie tego związku, który jest składnikiem oleju z oliwek, ma szczególne znaczenie ze względu na jego potencjalną rolę w prewencji i leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego [**P-H1**, **P-H2**].

Tabela 1. Porównanie metod izolacji oleaceiny [**P-H1**, **P-H2**].

Etap izolacji	Metoda pierwotna	Metoda zmodyfikowana
I ekstrakcja	4xwoda; łaźnia ultradźwiękowa; 30 min	4xwoda; łaźnia ultradźwiękowa; 30 min
II ekstrakcja	5x octan etylu (1:1)	5x eter dietylowy (1:1)
I rozdział	żel krzemionkowy; kolumna szklana (0.125–0.25mm; 5.5cm×10 cm); gradient chloroform-octan etylu (100-0%) i octan etylu- metanol (100-0%)	żel krzemionkowy (PF- 30 SIHP/80G PuriFlash); chromatografia typu Flash; układ izokratyczny chloroformu i octanu etylu (85:15)
II rozdział		żel krzemionkowy (PF- 30 SIHP/80G PuriFlash); chromatografia typu Flash; układ izokratyczny chloroformu i octanu etylu (85:15)
doczyszczanie	Sephadex; kolumna szklana (2×25 cm); układ izokratyczny chloroform- metanol (9:1)	Sephadex LH-20; kolumna szklana (2×45 cm); układ izokratyczny chloroform- metanol (9:1)

Zastrzeżeniem patentowym zostało objęte również potencjalne zastosowanie oleaceiny w leczeniu i prewencji chorób wynikających z rozpadu płytki miażdżycowej, takich jak niedokrwienny udar mózgu, zawał mięśnia sercowego czy choroba niedokrwienna serca. W badaniach udowodniono bowiem, że oleaceina w sposób zależny od stężenia hamuje sekrecję MMP-9, która jest proteazą odpowiedzialną za degradację macierzy zewnątrzkomórkowej, a tym samym sprzyja destabilizacji płytki miażdżycowej. Płytki miażdżycowe (n=15) były uzyskiwane od pacjentów poddawanych zabiegowi wycięcia błony wewnętrznej tętnicy szyjnej (endarterektomia). Uzyskane płytki dzielono na dwie części, które inkubowano w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (kontrola) lub w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej w obecności oleaceiny w stężeniach 5,10 i 20 μM przez 24 godziny po uprzedniej stymulacji roztworem lipopolisacharydu (LPS) o stężeniu 1 μg/ml. Wpływ oleaceiny na produkcję MMP-9 został określony przy użyciu metody immunoenzymatycznej ELISA. Ilość MMP-9 (ng/ml) przeliczano na masę płytki miażdżycowej, a następnie określono w % w porównaniu do kontroli stymulowanej. Wartość IC_{50} określono na poziomie 9,07 ± 1,2 μM. Wyniki przedstawiono na rycinie 4 [**P-H2**].



Rycina 4. Inhibicja sekrecji MMP-9 przez płytki miażdżycowe stymulowane LPS. OC – oleaceina w stężeniach OC5 - 5μM, OC10 μM – 10, OC20 - 20μM; kontrola n.st. (-) LPS, Kontrola st. (+) LPS.

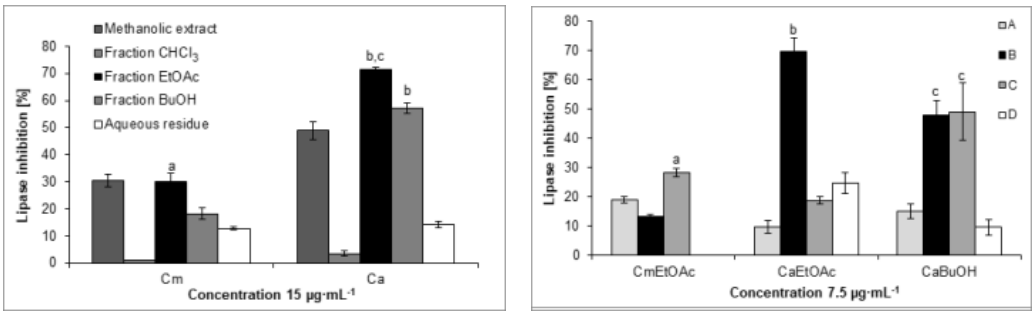
Z kolei wynikiem dalszych prac na modelu płytek miażdżycowych we współpracy z dr Agnieszką Filipek było stwierdzenie, że oleaceina zwiększa produkcję cytokiny przeciwzapalnej IL-10 przez komórki płytki miażdżycowej o 267,1 ± 61,5%. Ponadto w kompleksie z hemoglobiną i haptoglobiną 2-2 indukuje ekspresję białka CD163 (tzw. *scavenger receptor*) na powierzchni makrofagów. W związku z tym dochodzi do zmiany prozapalnego fenotypu M1 makrofagów na fenotyp przeciwzapalny M2, co ogranicza proces rozpadu płytek miażdżycowych i ryzyko mikrokrwawień [**P-H1**].

Inną techniką, która pozwala na poszukiwanie związków o określonej bioaktywności jest izolacja połączona z badaniami biologicznymi w warunkach *in vitro*. Metoda ta ułatwia szybką i selektywną identyfikację składników pochodzenia naturalnego o określonym punkcie uchwytu. W związku z tym została ona wykorzystana w celu identyfikacji aktywnych składników ziela jasnoty białej oraz owoców dereni – jadalnego i białego. Izolację składników jasnoty prowadzono na podstawie testów inhibicji uwalniania cytokin (IL-8, TNF-α) przez neutrofile, a w przypadku owoców dereni – inhibicji lipazy trzustkowej w warunkach *in vitro*. Wybór modelu biologicznego jako podstawy

do ukierunkowanej izolacji podyktowany był doniesieniami z medycyny tradycyjnej o określonych właściwościach prozdrowotnych badanych substancji roślinnych [**H3**, **H5**].

W celu potwierdzenia właściwości przeciwzapalnych ziela jasnoty białej, a jednocześnie zidentyfikowania składników aktywnych zastosowano technikę izolacji związków prowadzoną równolegle z badaniami *in vitro* na modelu ludzkich neutrofili [**H3**]. Biorąc pod uwagę nieznaczne różnice w składzie chemicznym kwiatów i ziela jasnoty, do izolacji związków wykorzystano części nadziemne. W wyniku rozdziału składników za pomocą rozpuszczalników o różnej polarności uzyskano 5 frakcji: chloroformową (CL), eteru dietylowego (DE), octanu etylu (EA), butanolową (B) oraz pozostałość wodną (AR). Spośród nich największą aktywnością hamującą sekrecję zarówno IL-8 jak i TNF-α wykazano dla frakcji DE. Komórki traktowane frakcją DE w stężeniu 50 µg/ml wydzielały 41,4 ± 4,1% TNF-α i 59,3 ± 15,2% IL-8 w porównaniu z komórkami kontrolnymi (100%). Aktywność hamującą sekrecję cytokin wykazały także frakcje EA oraz B, dlatego również zostały uwzględnione w badaniach. Dalszy rozdział składników frakcji DE, EA oraz B doprowadził do uzyskania podfrakcji DE1 – DE6, EA1 – EA9 oraz B1 – B5. Jednoczesna analiza aktywności biologicznej pozwoliła ustalić, że żadna z uzyskanych podfrakcji nie hamowała sekrecji IL-8. Z drugiej strony podfrakcje DE6, B3, B4 i B5 znacznie hamowały uwalnianie TNF-α przez neutrofile. Procent wydzielonego przez komórki TNF-α wyniósł odpowiednio 76,1 ± 3,2% (DE6), 75,0 ± 2,2% (B3), 60,0 ± 1,3% (B4) oraz 72,7 ± 1,9% (B5). Z podfrakcji DE6 wyizolowano kwas kawowy oraz tylirozyd, a także określono ich aktywność hamującą uwalnianie cytokin. Kwas kawowy nie miał wpływu na sekrecję cytokin. Został on po raz pierwszy wyizolowany z ziela jasnoty białej. Jednak biorąc pod uwagę strukturę fenylopropanoidów, kwas kawowy jest prawdopodobnie artefaktem – produktem hydrolizy fenylopropanoidów towarzyszącej procesowi ekstrakcji. Z kolei tylirozyd hamował sekrecję IL-8 (68,6 ± 10,0% względem kontroli), a nie wpływał na uwalnianie TNF-α. Następnie z podfrakcji $B3_{1B}$ wyizolowano karioptozyd. Jednak nie wykazał on znacznej aktywności hamującej sekrecję cytokin. Podfrakcje butanolowe B3 i B4 były natomiast szczególnie bogatym źródłem fenylopropanoidów. Dzięki zastosowaniu metody izolacji sprzężonej z badaniami biologicznymi na modelu ludzkich neutrofili, wyizolowano fenylopropanoidy lamiuzyd A (lamalbozyd), lamiuzyd B, lamiuzyd C oraz *trans*-lamiuzyd E, które wykazały aktywność hamującą uwalnianie IL-8. Wywnioskowano, że ziele jasnoty białej może być potencjalnym źródłem składników regulujących stan zapalny. Zastosowanie techniki łączącej izolację związków z materiału roślinnego z badaniami biologicznymi ułatwiło identyfikację związku – *trans*–lamiuzydu E – odznaczającego się najsilniejszą, statystycznie znamienną aktywnością biologiczną [**H3**].

W przypadku owoców derenia jadalnego (Cm) i białego (Ca) przeprowadzono izolację związków z ekstraktu metanolowego. Początkowo do rozdziału składników wykorzystano rozpuszczalniki o różnej polarności. Na podstawie testów inhibicji lipazy trzustkowej w warunkach *in vitro* wyselekcjonowano najbardziej aktywne frakcje octanu etylu (EtOAc) i butanolową (BuOH). Frakcje oznaczone jako CmEtOAc, CaEtOAc i CaBuOH w stężeniu 15 µg/ml hamowały aktywność lipazy trzustkowej o odpowiednio 30,2 ± 3,2%, 71,4 ± 0,9% i 57,0 ± 1,9% (Rycina 5).



Rycina 5. Inhibicja aktywności lipazy trzustkowej przez frakcje i podfrakcje uzyskane z owoców derenia jadalnego (Cm) i białego (Ca) [**H5**].

We frakcji octanu etylu z owoców derenia jadalnego CmEtOAc zidentyfikowano kwas loganowy, kornuzyd i 3-*O*-galaktozyd pelargonidyny. Natomiast we frakcjach uzyskanych z owoców derenia białego CaEtOAc i CaBuOH wykryto rutynę, hiperozyd oraz kwercyturon, a także astragalinę. W dalszej kolejności rozdział składników tych frakcji prowadzono za pomocą chromatografii kolumnowej i preparatywnej HPLC. Uzyskano podfrakcje oznaczone jako $CmEtOAc_A$ – $CmEtOAc_C$, $CaEtOAc_A$ – $CaEtOAc_D$ oraz $CaBuOH_A$ – $CaBuOH_D$. Jednocześnie wykazano, że najbardziej aktywna ze wszystkich uzyskanych - podfrakcja $CaEtOAc_B$ - hamowała aktywność lipazy trzustkowej o 69,9 ± 4,5%. Na podstawie analizy HPLC-DAD-MS/MS w podfrakcji tej stwierdzono obecność związków fenolowych. Niemniej jednak z podfrakcji $CaEtOAc_B$ wyizolowano i zidentyfikowano jedynie glukozyd hydroksytyrozolu. Wartość IC_{50} dla tego związku wyniosła 1,0 ± 0,1 mg/ml. W związku z tym wywnioskowano, że za aktywność frakcji odpowiedzialne są jej inne składniki. Z kolei z frakcji $CmEtOAc_A$ i $CmEtOAc_B$ wyizolowano irydoidy - kwas loganowy i kornuzyd - które nie hamowały jednak aktywności lipazy trzustkowej. Ostatecznie, izolacja związków z gatunków o odmiennym profilu fitochemicznym połączona z jednoczesną analizą aktywności lipazy trzustkowej pozwoliła na konkluzję, że związki fenolowe są silniejszymi inhibitorami tego enzymu niż irydoidy czy antocyjany [**H5**]. Ponadto w pracy tej przeprowadzono wstępne oznaczenia ilościowe całkowitej zawartości antocyjanów i związków fenolowych. Wykazano, że ekstrakty ze świeżych owoców derenia odznaczają się niższą zawartością związków fenolowych niż wyciągi z suszonych owoców. Z drugiej strony w wyciągach ze świeżych owoców zidentyfikowano antocyjany, które również zaliczane są do grupy polifenoli, ale nie stwierdzono ich obecności w suszonych owocach podczas analizy metodą HPLC. W oznaczeniu ilościowym odnotowano w nich również znacznie niższą zawartość antocyjanów niż w wyciągach ze świeżych owoców. Prawdopodobnie pulę związków fenolowych w suszonych owocach powiększają związki o charakterze garbników. Antocyjany są natomiast związkami wysoce reaktywnymi, które w procesach degradacji tracą swoją charakterystyczne barwy. Na ich stabilność wpływają czynniki, takie jak temperatura, światło, pH środowiska, czynniki utleniające, enzymy, cukry czy kwas askorbinowy. Wywnioskowano, że niższa zawartość antocyjanów w próbkach komercyjnie dostępnych może być wynikiem kinetycznego rozkładu podczas suszenia lub przechowywania [**H5**]. Z drugiej strony antocyjany biogenetycznie związane są z flawonoidami, pochodnymi flawan-3,4-dioli (leukocyjanidyny) i flawan-3-oli, które ulegają procesom kondensacji. Produktem polimeryzacji

są garbniki skondensowane [60]. W związku z tym w suszonych owocach częściej występują związki z grupy garbników, a antocyjany nie są w nich spotykane.

Z przeprowadzonych badań wynika, że zarówno czas zbioru surowca, sposób przechowywania materiału roślinnego jak i sposób przygotowania ekstraktów determinuje ich skład chemiczny ze względu na labilność wielu substancji. Zatem czynniki te należy uwzględnić już na wstępnych etapach prac mających na celu pozyskanie pojedynczych substancji chemicznych z materiału roślinnego. Należy zwrócić przy tym uwagę, że przekazy ludowe i tradycyjnie stosowane przetwory stanowią cenną bazę, wskazującą kierunek poszukiwań związków o potencjalnym znaczeniu leczniczym. Zwykle prowadzona izolacja składników wyciągów wymaga pracochłonnych etapów rozdziału, detekcji i identyfikacji związków, a w końcu przesiewowego poszukiwania ich potencjalnej aktywności biologicznej. Wykorzystana w badaniach metoda izolacji umożliwia natomiast ograniczenie czasu izolacji i środków w porównaniu z metodami tradycyjnymi. W obu opisanych pracach dzięki zastosowanej technice jednoznacznie zidentyfikowano grupy związków chemicznych, które mogą warunkować efekt terapeutyczny badanych substancji roślinnych [**H3, H5**].

Weryfikacja hipotezy HT3

Tradycyjne zastosowanie substancji roślinnych bogatych w irydoidy, fenylopropanoidy oraz flawonoidy w stanach zapalnych może być wynikiem ich aktywności antyoksydacyjnej i hamującej wydzielanie mediatorów stanu zapalnego przez ludzkie neutrofile czy fibroblasty poddane działaniu ekstraktów roślinnych lub izolowanych związków [**H2**, **H3**, **H7**].

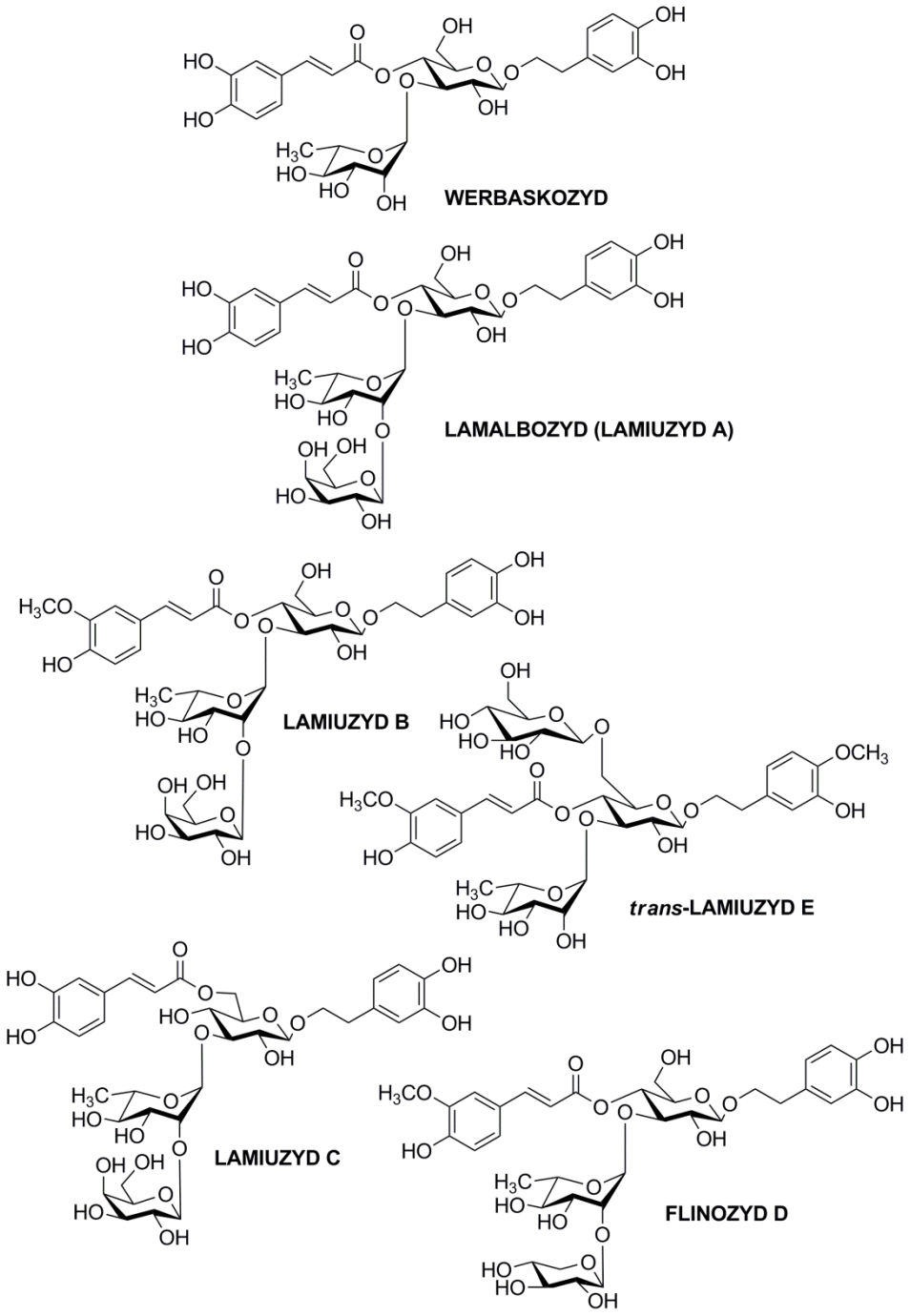
Napary z ziela jasnoty białej w medycynie ludowej były stosowane w stanach zapalnych i wykwitach skóry. Z kolei nalewki i inne ekstrakty, według przesłanek ludowych, wykazywały działanie przeciwskurczowe i znajdowały zastosowanie w leczeniu nasilonych krwawień miesiączkowych, krwotoków z macicy, upławów oraz stanów zapalnych dróg rodnych. Niekiedy właściwości przeciwzapalne kwiatów lub ziela jasnoty były wykorzystywane w przewlekłych stanach zapalnych dróg oddechowych [75-77]. Mimo że jak dotąd zidentyfikowano wiele składników chemicznych jasnoty białej, ich rola biologiczna w odniesieniu do efektów terapeutycznych opisanych w medycynie ludowej nie została w pełni wyjaśniona. Dlatego celem pracy było zbadanie udziału ekstraktów przygotowanych z kwiatów i ziela jasnoty białej oraz ich składników w regulacji odpowiedzi zapalnej ludzkich neutrofili. Neutrofile, należące do grupy granulocytów obojętnochłonnych, pełnią zasadniczą rolę w odpowiedzi układu immunologicznego przeciwko patogenom poprzez tzw. wybuch tlenowy i wydzielanie innych czynników przeciwbakteryjnych [78]. Biorąc pod uwagę, że molekularne ścieżki sygnałowe są inicjowane przez różne ligandy, w poszukiwaniu potencjalnego mechanizmu działania ekstraktów, produkcję reaktywnych form tlenu indukowano za pomocą f-MLP (N-formylo-L-metionylo-L-leucylo-fenyloalanina) lub PMA (12-mirystyniano-13-octan forbolu). Pierwszy z nich jest czynnikiem chemotaktycznym leukocytów, który wiąże się z receptorem powierzchniowym sprzężonym z białkiem G i na tej drodze aktywuje

ścieżki sygnałowe z udziałem fosfolipazy C i kinaz białkowych aktywowanych mitogenem [79]. Natomiast PMA jest bezpośrednim agonistą kinazy białkowej C [80]. Z kolei indukcja receptrów TLR-4 za pomocą LPS stymuluje produkcję cytokin w komórkach [81].

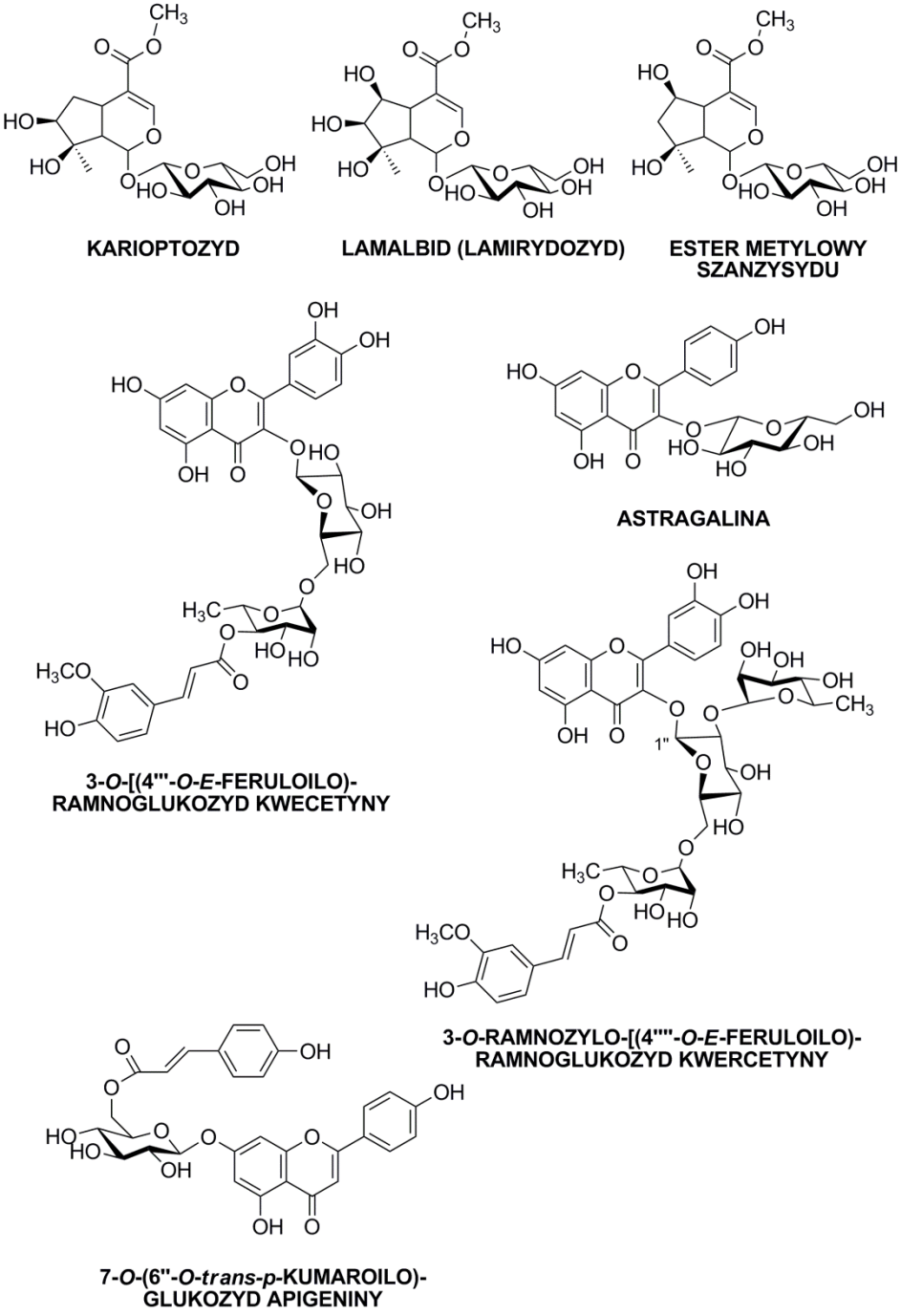
W pierwszej części badań porównano aktywność wyciągów przygotowanych z kwiatów lub ziela jasnoty. Oba ekstrakty w zakresie stężeń 25 -100 μg/ml zmniejszały sekrecję RFT, MPO oraz IL-8. Komórki traktowane wyciągiem etanolowym z kwiatów w stężeniu 25 μg/ml wydzielały 44,8 ± 3,3% i 56,6 ± 3,3% RFT po indukcji odpowiednio f-MLP lub PMA, 56,3 ± 9,3% MPO oraz 82,1 ± 7,2% IL-8 w porównaniu z kontrolą (100%). Z drugiej strony, wyciąg etanolowy z ziela w stężeniu 25 μg/ml w mniejszym stopniu hamował wydzielanie RFT (65,4 ± 2,3% względem kontroli w modelu f-MLP; 54,4 ± 2,1% względem kontroli w modelu PMA) oraz MPO (60,1 ± 7,8% względem kontroli). Oba wyciągi, z wyjątkiem wyciągu z kwiatów w najwyższym stężeniu, tj. 100 μg/ml, nie hamowały sekrecji TNF-α [**H3**].

Wyizolowane z ziela jasnoty białej związki, poza karioptozydem i astragaliną, hamowały tzw. wybuch tlenowy w ludzkich neutrofilach stymulowanych f-MLP [**H3**, **H7**]. Największą aktywnością przeciwutleniającą odznaczały się pochodne kwercetyny oraz fenylopropanoidy, takie jak lamalbozyd i lamiuzyd B [**H3**, **H7**]. Znaczną inhibicję wydzielania IL-8 zaobserwowano w przypadku *trans*-lamiuzydu E (29,5 ± 7,1%), astragaliny (49.9 ± 8.1%), flinozydu D (53.7 ± 4.5%) oraz 3-*O*-(4'''-*O*-*E*-feruloilo)ramnoglukozydu kwercetyny (56.0 ± 8.1%) w stężeniu 25 μM w porównaniu z kontrolą (100%). Do grupy związków wykazujących mniej znaczącą aktywność hamującą sekrecję IL-8 zaliczono werbaskozyd (60.8 ± 5.1%), lamiuzyd B (64,7 ± 5,2%) oraz 3-*O*-ramnozylo-(4''''-*O*-*E*-feruloilo)ramnoglukozyd kwercetyny (65.9 ± 4.9%) [**H3**, **H7**]. Spośród irydoidów lamalbid odznaczał się największą aktywnością (60.1 ± 5.1%) w porównaniu z karioptozydem i estrem metylowym szanzysydu [**H3**, **H7**]. Większość związków nie hamowała natomiast uwalniania TNF-α [**H3**]. Jedynie w najwyższym stężeniu 25 μM 7-*O*-(6''-trans-*p*-kumaroilo)-glukozyd apigeniny, 3-*O*-(4'''-*O*-*E*-feruloilo)ramnoglukozyd kwercetyny, werbaskozyd, lamalbid i flinozyd D w sposób znamienny statystycznie redukowały sekrecję TNF-α przez komórki stymulowane LPS [**H7**]. Biorąc pod uwagę, że stres oksydacyjny towarzyszy reakcji zapalnej i pośredniczy w nasileniu produkcji cytokin, substancje naturalne z ziela jasnoty o właściwościach przeciwutleniających mogą ograniczać proces zapalny. Reaktywne formy tlenu sprzyjają bowiem wydzielaniu m. in. IL-1β i TNF-α w odpowiedzi na LPS oraz pośredniczą w ścieżce sygnałowej IL-8 po indukcji LPS/TLR4. Co więcej niektóre cytokiny prozapalne, takie jak IL-1β i TNF-α, są induktorami uwalniania IL-8. Związki przeciwutleniające hamują translokację czynnika transkrypcyjnego NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), a tym samym produkcję IL-8 w komórkach układu immunologicznego. Takie właściwości przypisuje się flawonoidom, fenylopropanoidom oraz irydoidom. Bardziej znaczący wpływ fenylopropanoidów na funkcje zapalne neutrofili, w porównaniu z irydoidami, może być wynikiem ich większej aktywności przeciwutleniającej. Z drugiej strony irydoidy w ekstraktach z ziela jasnoty białej występują w formie glikozydów [**H3**, **H7**]. Natomiast ich aktywność często wzrasta po hydrolizie, jak to obserwowano w przypadku oleuropeiny i jej aglikonu – oleaceiny – oznaczonych w ekstraktach z liści ligustra w pracach **H1, H2**

i **H4**. Dlatego irydoidy prawdopodobnie w mniejszym stopniu hamują uwalnianie cytokin, co jednak nie wyklucza ich znaczenia po zastosowaniu miejscowym, jak opisano w pracy **H2**. Zarówno irydoidy jak i fenylopropanoidy nie wpływały na sekrecję TNF-α. Lamiuzyd C nawet nasilał sekrecję tej cytokiny. Niemniej jednak TNF-α może niekiedy redukować stabilność mRNA IL-8 i nasilać produkcję cytokiny przeciwzapalnej IL-10 w monocytach. Dlatego wzrost stężenia TNF-α pod wpływem lamiuzydu C może odgrywać pozytywną rolę w niektórych interakcjach międzykomórkowych w miejscu zapalenia [**H3**]. Lamiuzyd B, *trans*-lamiuzyd E i flinozyd D były najbardziej aktywnymi fenylopropanoidami wyizolowanymi z ziela jasnoty białej. Zarówno flinozyd D jak i lamiuzyd B charakteryzują się obecnością podstawnika feruloilowego zamiast kawoilowego. Z kolei *trans*-lamiuzyd E odznacza się obecnością, poza podstawnikiem feruloilowym, dodatkowej grupy metoksylowej. Wywnioskowano, że taka struktura może nasilać aktywność hamującą uwalnianie cytokin niezależnie od aktywności przeciwutleniającej. W porównaniu z fenylopropanoidami posiadającymi dwa pierścienie dihydroksyfenylowe (lamalabozyd, lamiuzyd C), forma *trans*-lamiuzydu E w mniejszym stopniu hamuje produkcję RFT (25 μM, 41,0 ± 3,4% w porównaniu z kontrolą). Natomiast lamiuzyd B (25 μM, 23,3 ± 3,6%) i flinozyd D (25 μM, 21,0 ± 3,4%), ze względu na obecność jednego pierścienia dihydroksyfenylowego, zachowują bardziej znaczącą aktywność przeciwutleniającą w porównaniu z *trans*-lamiuzydem E. Struktury wyizolowanych związków przedstawiono na rycinach 6. i 7.



Rycina 6. Struktury fenylopropanoidów wyizolowanych z ziela jasnoty białej.



Rycina 7. Struktury irydoidów i flawonoidów wyizolowanych z ziela jasnoty białej.

Z przeprowadzonych badań wynika, że struktura flawonoli, w większym stopniu niż grupy dihydroksyfenylowe fenylopropanoidów, koreluje z aktywnością przeciwutleniającą i dlatego pochodne kwercetyny najsilniej hamują wybuch tlenowy. Z drugiej strony obie wyizolowane pochodne kwercetyny posiadają również podstawniki feruloilowe i hamują sekrecję IL-8 porównywalnie z fenylopropanoidami [**H7**]. Przegląd aktywności związków wyizolowanych z ziela jasnoty białej pozwolił wywnioskować, że fenylopropanoidy, irydoidy i flawonoidy są biologicznie aktywnymi związkami w tym surowcu. W opisanych strukturach podstawniki kawoilowe, feruloilowe i rdzeń flawonolu prawdopodobnie determinują potencjalny wpływ na ścieżki przekazywania sygnału

w odpowiedzi zapalnej. Duże znaczenie odgrywa inhibicja produkcji RFT przez wyizolowane związki, która pośrednio hamuje produkcję cytokin, a tym samym ogranicza nieinfekcyjny, przewlekły stan zapalny. Przeprowadzone badania stanowią zatem częściowe uzasadnienie tradycyjnego zastosowania ekstraktów z ziela jasnoty białej w chorobach o podłożu zapalnym.

Z przeprowadzonych analiz jakościowych i ilościowych wyciągów z liści oliwki i ligustra wynika, że również są one bogatym źródłem związków fenolowych o właściwościach przeciwutleniających. Szczególnie przetwory z liści oliwki uważane są za środki o działaniu przeciwzapalnym i ich właściwości biologiczne były wielokrotnie opisywane. W rejonie Morza Śródziemnego odwary z liści oliwki stosowano tradycyjnie w leczeniu miejscowym guzków, stanów zapalnych skóry, ranach i oparzeniach [82]. Dlatego w pracy **H2** wyciągi z liści oliwki zostały wykorzystane jako substancja referencyjna, a celem badania było określenie i porównanie aktywności przeciwutleniającej, cytoprotekcyjnej i antyapoptotycznej wyciągów z liści ligustra i oliwki na ludzkich fibroblastach (NHDF). Często stosowanym induktorem w modelu fibroblastów bywa nadtlenek wodoru. Niemniej jednak składniki badanych w pracy **H2** ekstraktów wykazują zdolność wymiatania nadtlenku wodoru. W związku z tym w zastosowanym modelu wykorzystano promieniowanie UVA (25 J/cm^2) w celu indukcji produkcji RFT przez komórki. Jedynie wyciąg wodny z liści ligustra w stężeniu 5 µg/ml w sposób znamienny statystycznie hamował produkcję RFT w tym modelu. Prawdopodobnie wynika to z niestabilności składników wyciągów, głównie sekoirydoidów, które ulegają degradacji pod wpływem promieniowania UVA. Reaktywne formy tlenu, poza stymulacją ścieżek sygnałowych uwalniania markerów stanu zapalnego, indukują także procesy apoptozy w warunkach fizjologicznych i patofizjologicznych. Podczas gojenia ran duże znaczenie odgrywa żywotność i proliferacja komórkowa. Wykazano, że wyciągi wodne z liści ligustra zapobiegają obniżaniu żywotności oraz opóźniają proces apoptozy fibroblastów poddawanych działaniu UVA. Natomiast efektu fotoprotekcyjnego nie zaobserwowano w przypadku ekstraktów etanolowych. Mechanizm tego działania można tłumaczyć obecnością związków lipofilnych niezarejestrowanych na chromatogramach HPLC, m.in. kwasów tłuszczowych czy steroli, lub związków fototoksycznych w wyciągach etanolowych. Niektóre składniki fototoksyczne pod wpływem promieniowania UV mogą bowiem generować RFT, które uruchamiają procesy peroksydacji kwasów tłuszczowych. W ten sposób można wytłumaczyć nieznaczny efekt przeciwutleniający badanych wyciągów. Ostatecznie, nie wykazano znaczących różnic w aktywności ekstraktów z liści oliwki i ligustra. Zwłaszcza wyciągi wodne z obu spokrewnionych substancji roślinnych wykazują działanie fotoprotekcyjne, co częściowo potwierdza ich ludowe zastosowanie w leczeniu chorób skóry [**H2**]. Biorąc pod uwagę, że wyciągi te zawierają charakterystyczne formy aglikonowe sekoirydoidów – oleaceinę i oleokantal – nie można wykluczyć roli tych związków w miejscowej terapii stanów zapalnych.

Weryfikacja hipotezy HT4

Zastosowanie substancji roślinnych z rodzaju *Ligustrum* i *Cornus* w leczeniu chorób metabolicznych w tradycyjnej medycynie chińskiej pozwala przypuszczać, że ekstrakty roślinne bogate w irydoidy,

fenylopropanoidy oraz flawonoidy hamują rozwój bólu neuropatycznego towarzyszącego cukrzycy [**H4**] lub pełnią rolę inhibitorów trzustkowych enzymów trawiennych [**H5**].

Gatunki należące do rodzaju *Ligustrum* rozpowszechnione w Europie i Azji od dawna są stosowane w TCM. Wchodzą w skład złożonych mieszanek (m. in. *Ku-Ding-Cha*), które tradycyjnie były stosowane w leczeniu stanów zapalnych jamy ustnej i gradła, bólach głowy, nadciśnieniu oraz cukrzycy. Odwary przygotowane z takich mieszanek, zawierających owoce *Ligustrum lucidum*, skutecznie łagodziły bóle neuropatyczne u pacjentów poddawanych chemioterapii czy cierpiących z powodu przepukliny dysku lędźwiowego [83, 84]. Ponadto niektóre gatunki z rodziny Oleaceae wykazują działanie przeciwcukrzycowe opóźniając procesy apoptozy indukowanej wysokim poziomem glukozy i hamując rozwój bólu neuropatycznego. Na tej podstawie celem badania **H4** stała się ocena znaczenia wyciągu wodnego z liści ligustra pospolitego jako środka łagodzącego objawy hiperalgezji (nasilona zdolność odczuwania bólu) i allodynii (utrata czucia bólu) na modelu szczurów, u których cukrzycę indukowano streptozotocyną. W badaniu zastosowano testy Randall-Selitto i von Frey'a. Podawany szczurom w dawkach 50, 100 i 200 mg/kg m.c./dzień wyciąg wodny z liści ligustra zawierający 23,5 mg/g oleaceiny łagodził objawy hiperalgezji już po sześciu dniach stosowania. Działanie to utrzymywało się przez cały okres eksperymentu. Przy zastosowaniu dawki 50 mg/kg nastąpiła redukcja mechanicznej hiperalgezji (60,8%). Dodatkowo ekstrakt w dawkach 100 i 200 mg/kg, oprócz znacznego działania zmniejszającego hiperalgezję, wykazywał działanie antynocyceptywne już po dwóch dniach stosowania. Ekstrakt wodny z liści ligustra powodował zależne od dawki i długotrwałe odwrócenie objawów allodynii u szczurów po podaniu przewlekłym. Jedynie zwierzęta, którym podawano wyciąg w dawce 200 mg/kg doświadczały przemijającej analgezji w dziesiątym dniu eksperymentu. Badany wyciąg odznaczał się większą skutecznością w łagodzeniu bólu neuropatycznego niż tramadol w dawce 8 mg/kg m.c. – zastosowany jako substancja kontrolna. Zaobserowowano, że wyciąg wodny z liści ligustra w dawkach 100 i 200 mg/kg powodował również utratę masy ciała szczurów o odpowiednio 37% i 29% po 21 dniach aplikacji dootrzewnowej. Wywnioskowano, że oleaceina jako dominujący składnik wyciągu może wpływać na pobudliwość neuronalną poprzez hamowanie nadekspresji kanałów wapniowych. Natomiast skuteczność ekstraktu w neuropatii cukrzycowej nie jest związana z efektem hipoglikemicznym jego składników aktywnych [**H4**].

W Europie i południowozachodniej Azji owoce derenia jadalnego były wykorzystywane w leczeniu schorzeń żołądkowo-jelitowych czy biegunce. Obecnie pełnią głównie rolę spożywczą, gdyż są stosowane w postaci nalewek, soków i dżemów. Niemniej jednak owoce z rodzaju *Cornus* wchodzą w skład mieszanek ziołowych TCM stosowanych w celu poprawy funkcji nerek czy wątroby [3]. Mimo naukowych doniesień o ich potencjalnym znaczeniu fitoterapeutycznym, mechanizm działania przeciwcukrzycowego czy regulującego poziom lipidów nie został wyjaśniony. Jednym z nich jest inhibicja enzymów trawiennych, które są odpowiedzialne za degradację tłuszczu i skrobii. Inhibitory tych enzymów, takie jak orlistat i akarboza, są stosowane w lecznictwie. Jednak terapia za pomocą akarbozy czy orlistatu jest przyczyną wielu działań niepożądanych, głównie

ze strony przewodu pokarmowego. Poza tym leczenie hiperlipidemii i innych schorzeń metabolicznych wciąż wydaje się być wyzwaniem. Dlatego poszukiwanie naturalnych inhibitorów enzymów trawiennych o niskim wskaźniku skutków ubocznych jest uzasadnione. W związku z tym celem pracy **H5** było określenie zdolności hamowania aktywności enzymów trawiennych, takich jak lipaza trzustkowa czy α-amylaza, przez ekstrakty przygotowane z owoców rodzimych gatunków derenia jadalnego i białego. Ekstrakty wodne, wodno-etanolowe (60%, v/v) i metanolowe przygotowano ze świeżych owoców derenia jadalnego i białego, jak również z suszonych owoców derenia jadalnego zakupionych w sklepach zielarskich (Dary Natury, Eko Herba). Zarówno wyciągi z owoców derenia jadalnego jak i białego silniej hamowały aktywność lipazy trzustkowej niż α-amylazy. Wyciągi, dla których wartość IC_{50} wyniosła ponad 200 µg/ml zostały uznane za nieaktywne. Wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Inhibicja aktywności lipazy trzustkowej i α-amylazy. Wartości IC_{50} wyciągów z owoców derenia jadalnego (Cm) i białego (Ca) [**H5**].

Lipaza trzustkowa IC_{50} ± SD [µg/ml]				
Owoce suszone	**Cm**	**CmDN**	**CmEH**	**Ca**
Ekstrakt wodny	34,2 ± 4,2	112,0 ± 18,0	61,4 ± 4,3	22,6 ± 3,0
Ekstrakt etanolowy	15,2 ± 3,9	57,7 ± 8,6	59,0 ± 9,6	25,3 ± 2,0
Ekstrakt metanolowy	48,3 ± 12,0	n.d.	n.d.	13,4 ± 3,6
Orlistat	2,6 ± 0,5 nM (1,3 ± 0,3 ng/ml)			
α-Amylaza IC_{50} ± SD [µg/ml]				
Owoce suszone	**Cm**	**CmDN**	**CmEH**	**Ca**
Ekstrakt wodny	134,0 ± 6,4	n.a.	n.a.	136,0 ± 13,1
Ekstrakt etanolowy	92,5 ± 16,6	n.a.	n.a.	110,0 ± 5,6
Ekstrakt metanolowy	79,0 ± 0,1	n.d.	n.d.	112,0 ± 2,3
Akarboza	3,7 ± 0,6 µM (2,4 ± 0,4 µg/ml)			

Cm – liofilizowane *Cornus mas*, CmDN – *Cornus mas* Dary Natury, CmEH – *Cornus mas* Eko Herba, Ca – liofilizowane *Cornus alba*; n.a. – nieaktywne (IC_{50} > 200 µg/ml), n.d. – nie określono

Na tej podstawie wywnioskowano, że ekstrakty ze świeżych owoców derenia jadalnego odznaczają się większą aktywnością w porównaniu z ekstraktami przygotowanymi z suszonych owoców zakupionych w sklepach zielarskich. Spośród przetworów zwykle stosowanych przez pacjentów wyciągi etanolowe z owoców derenia jadalnego odznaczały się większą aktywnością hamującą lipazę trzustkową i α-amylazę. Wykazano także pewną zależność między całkowitą zawartością związków fenolowych a potencjałem hamującym aktywność enzymów trawiennych, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi. Niektóre owoce bogate w antocyjany uznawane są za substancje naturalne regulujące metabolizm tłuszczów. Niemniej jednak w przeprowadzonym badaniu okazało się, że wyizolowane związki nie wykazują tak znacznego działania jak frakcje, z których zostały pozyskane. Dlatego efekt hamujący enzymy trzustkowe może być wynikiem synergistycznego działania poszczególnych składników. Z drugiej strony złożony skład preparatów może uniemożliwiać nadmierną inhibicję aktywności enzymów, która nie jest pożądana ze względu na działania niepożądane, takie jak wzdęcia czy biegunki, jak w przypadku akarbozy i orlistatu. W związku z tym owoce derenia jadalnego stosowane tradycyjnie jako składnik diety mogą być

środkiem o prawdopodobnym znaczeniu w leczeniu hiperlipidemii poprzez inhibicję enzymów trawiennych. W wyniku przeprowadzonych prac stwierdzono, że związki fenolowe w większym stopniu niż irydoidy czy antocyjany odpowiadają za to działanie [**H5**].

Spokrewnione gatunki roślin azjatyckich i europejskich ze względu na powiązania chemotaksonomiczne mogą wykazywać zbliżony efekt terapeutyczny. Bywa, że gatunki azjatyckie są częściej stosowane w medycynie tradycyjnej. Do takich można zaliczyć *Ligustrum lucidum* czy *Cornus officinalis*. Natomiast niektóre gatunki występujące w Europie nie cieszą się taką popularnością w medycynie ludowej (*Ligustrum vulgare*) lub są stosowane w celach spożywczych (*Cornus mas*). Dlatego na przykładzie pokrewnych gatunków z rodzaju *Cornus* porównano udokumentowane właściwości terapeutyczne derenia jadalnego i derenia lekarskiego na podstawie ich składu chemicznego [**H6**]. Głównym celem pracy przeglądowej było podsumowanie dotychczasowej wiedzy dotyczącej badań aktywności owoców derenia stosowanych w Europie i Azji, a także wyróżnienie podobieństw i różnic fitochemicznych owoców obu gatunków w odniesieniu do udowodnionej aktywności biologicznej. Występowanie metabolitów wtórnych jest uzależnione od wielu czynników środowiskowych takich jak położenie geograficzne, klimat czy warunki uprawy. Wielokrotnie prowadzono badania jakości owoców derenia jadalnego ze względu na praktykę przygotowywania z nich nalewek, likierów, soków i dżemów. Natomiast problem standaryzacji substancji roślinnych stosowanych w TCM jest prawdopodobnie przyczyną braku takich szczegółowych oznaczeń składników w owocach derenia azjatyckiego. Oba gatunki charakteryzują się obecnością irydoidów, antocyjanów i flawonoidów. W obu stwierdzono również występowanie irydoidów (loganina, kwas loganowy, kornuzyd) jako podstawowych markerów chemotaksonomicznych. Jednak unikalnym irydoidem zidentyfikowanym jedynie w owocach derenia azjatyckiego jest moronizyd i jego izomery. Antocyjany, takie jak 3-*O*-galaktozydy pelargonidyny, cyjanidyny i delfinidyny, występują w obu gatunkach. Mimo bliskiego pokrewieństwa filogenetycznego derenia jadalnego i lekarskiego, garbniki występują głównie w owocach derenia lekarskiego. Składniki przetworów z owoców obu gatunków odpowiadają za ich właściwości przeciwcukrzycowe, nefroprotekcyjne, hepatoprotekcyjne i neuroprotekcyjne. U podstaw opisanych działań leży efekt przeciwutleniający oraz łagodzenie objawów stanu zapalnego poprzez ścieżki sygnałowe związane z NF-κB lub MAPK (kinazy aktywowane mitogenami). Pozytywny efekt w leczeniu hiperlipidemii oraz działanie antykoagulacyjne przypisano jedynie składnikom owoców derenia jadalnego. Nie można jednak wykluczyć, że z powodu położenia geograficznego, różnic kulturowych i innych upodobań dietetycznych, tego typu badań owoców derenia lekarskiego nie prowadzono w Azji. Wykazane w pracy przeglądowej podobieństwa i różnice wskazują potrzebę wymiany doświadczeń terapeutycznych między tradycyjną medycyną europejską i chińską. Brak jest bowiem dedykowanych badań porównawczych standaryzowanych substancji roślinnych o udowodnionym w warunkach *in vitro* i *in vivo* działaniu biologicznym/farmakologicznym. Dopiero taki kompleksowy opis pozwala na ustalenie podobieństwa etnofarmakologicznego [**H6**].

Najważniejsze osiągnięcia prowadzonych prac:

- opracowanie metod oceny ilościowej składników przetworów uzyskanych z liści ligustra pospolitego oraz optymalizacja czasu zbioru surowca w celu ukierunkowanej izolacji oleaceiny o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym w prewencji chorób o podłożu zapalnym, takich jak miażdżyca;
- wykazanie na modelu *in vivo* działania łagodzącego ból neuropatyczny, spowodowany procesami związanymi z cukrzycą, przez ekstrakt wodny z liści ligustra pospolitego o znacznej zawartości oleaceiny;
- wyizolowanie i ocena aktywności biologicznej irydoidów, fenylopropanoidów i flawonoidów z ziela jasnoty białej ze wskazaniem w badanej substancji roślinnej fenylopropanoidów jako klasy związków o największym potencjale hamującym sekrecję cytokin;
- wykazanie zdolności hamowania aktywności lipazy trzustkowej i α-amylazy przez wyciągi z owoców derenia jadalnego i derenia białego oraz wykazanie większej aktywności flawonoidów w porównaniu z irydoidami czy antocyjanami obecnymi w badanych substancjach roślinnych.

Piśmiennictwo

[1] Wang, M., Franz, G. The role of the European Pharmacopoeia (Ph Eur)in Quality Control of Traditional Chinese HerbalMedicine in European Member States. *World Journal of Traditional Chinese Medicine* **2015,** 1, 5-15.
[2] Macková, A., Mučaji, P., Widowitz, U., Bauer, R. *In vitro* anti-inflammatory activity of *Ligustrum vulgare* extracts and their analytical characterization. *Natural Product Communications* **2013,** 8, 1509-1512.
[3] Liu, X., Han, Z. P., Wang, Y. L., Gao, Y., Zhang, Z. Q. Analysis of the interactions of multicomponents in *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. with human serum albumin using on-line dialysis coupled with HPLC. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2011,** 879, 599-604.
[4] Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J. *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*. CRC Press: Boca Raton, 2011.
[5] Gao, B. B., She, G. M., She, D. M. Chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Ligustrum*. *Chemistry and Biodiversity* **2013,** 10, 96-128.
[6] Strzelecka, H., Kowalski, J. *Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa*. Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 2000.
[7] Pieroni, A. Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy. *Journal of Ethnopharmacology* **2000,** 70, 235-273.
[8] Pieroni, A., Pachaly, P. An ethnopharmacological study on common privet (*Ligustrum vulgare*) and phillyrea (*Phillyrea latifolia*). *Fitoterapia* **2000,** 71 Suppl 1, S89-94.
[9] Scherrer, A. M., Motti, R., Weckerle, C. S. Traditional plant use in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy). *Journal of Ethnopharmacology* **2005,** 97, 129-143.
[10] De Vos, P. European materia medica in historical texts: longevity of a tradition and implications for future use. *Journal of Ethnopharmacology* **2010,** 132, 28-47.
[11] Romani, A., Pinelli, P., Mulinacci, N., Vincieri, F. F., Gravano, E., Tattini, M. HPLC analysis of flavonoids and secoiridoids in leaves of *Ligustrum vulgare* L. (Oleaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000,** 48, 4091-4096.
[12] Šeršeň, F., Mučaji, P., Grančai, D., Nagy, M., Švajdlenka, E. Constituents of Butanol extract from leaves of *Ligustrum vulgare* L. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae* **2006,** 53, 253-261.
[13] Pieroni, A., Pachaly, P., Huang, Y., Van Poel, B., Vlietinck, A. J. Studies on anti-complementary activity of extracts and isolated flavones from *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* leaves (Oleaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **2000,** 70, 213-217.
[14] Hammermann, A., Damirov, J., Sokolov, W. Some promising plants of popular medicine in Azerbaijan. *Planta Medica* **1971,** 20, 374-380.
[15] Antonone, R., De Simone, F., Morrica, P., Ramundo, E. Traditional phytotherapy in the Roccamonfina volcanic group, Campania, southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology* **1988,** 22, 295-306.
[16] Mučaji, P., Záhradníková, A., Bezáková, L., Cupáková, M., Rauová, D., Nagy, M. HPLC determination of antilipoxygenase activity of a water infusion of *Ligustrum vulgare* L. leaves and some of its constituents. *Molecules* **2011a,** 16, 8198-8208.
[17] Czerwińska, M. E., Granica, S., Kiss, A. K. Effects of an aqueous extract from leaves of *Ligustrum vulgare* on mediators of inflammation in a human neutrophils model. *Planta Medica* **2013,** 79, 924-932.
[18] Curčić, M., Stanković, M., Mrkalić, E., Matović, Z., Banković, D., Cvetković, D., Dačić, D., Marković, S. Antiproliferative and proapoptotic activities of methanolic extracts from *Ligustrum vulgare* L. as an individual treatment and in combination with palladium complex. *International Journal of Molecular Science* **2012,** 13, 2521-2534.

[19] Nagy, M., Križková, L., Mučaji, P., Kontšeková, Z., Šeršeň, F., Krajčovič, J. Antimutagenic activity and radical scavenging activity of water infusions and phenolics from *Ligustrum* plants leaves. *Molecules* **2009,** 14, 509-518.
[20] Mučaji, P., Nagy, M., Grančai, D., Švajdlenka, E. Flavonoid glycosides of *Ligustrum vulgare* L. *Farmaceuticky Obzor* **2006,** 75, 266-271.
[21] Mučaji, P., Nagy, M., Záhradníková, A., Holková, I., Bezáková, L., Švajdlenka, E., Liptaj, T., Prónayová, N. Polar constituents of *Ligustrum vulgare* L. and their effect on lipoxygenase activity. *Chemical Papers* **2011b,** 65, 367-372.
[22] Kiss, A. K., Mańk, M., Melzig, M. F. Dual inhibition of metallopeptidases ACE and NEP by extracts, and iridoids from *Ligustrum vulgare* L. *Journal of Ethnopharmacology* **2008,** 120, 220-225.
[23] Hansen, K., Adsersen, A., Brøgger Christensen, S., Rosendal Jensen, S., Nyman, U., Wagner Smitt, U. Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor from *Olea europaea* and *Olea lancea*. *Phytomedicine* **1996,** 2, 319-325.
[24] Chudnicka, A., Matysik, G. Research of enzymatic activities of fresh juice and water infusions from dry herbs. *Journal of Ethnopharmacology* **2005,** 99, 281-286.
[25] Yalçin, F. N., Kaya, D. Ethnobotany, pharmacology and phytochemistry of the genus *Lamium* (Lamiaceae). *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006,** 31, 43-53.
[26] Matkowski, A., Piotrowska, M. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia* **2006,** 77, 346-353.
[27] Trouillas, P., Calliste, C. A., Allais, D. P., Simon, A., Marfak, A., Delage, C., Duroux, J. L. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry* **2003,** 80, 399-407.
[28] Paduch, R., Wójciak-Kosior, M., Matysik, G. Investigation of biological activity of *Lamii albi flos* extracts. *Journal of Ethnopharmacology* **2007,** 110, 69-75.
[29] Todorov, D., Dimitrova, M., Shishkova, K., Yordanova, Z., Kapchina-Toteva, V., Shishkov, S. Comparative anti-herpes effects of the chloroform *in vitro* and *in vivo* extracts, derived from *Lamium album* L. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* **2013,** 19, 190-193.
[30] Alipieva, K., Kokubun, T., Taskova, R., Evstatieva, L., Handjieva, N. LC-ESI-MS analysis of iridoid glucosides in *Lamium* species. *Biochemical Systematics and Ecology* **2007,** 35, 17-22.
[31] Alipieva, K. I., Taskova, R. M., Jensen, S. R., Handjieva, N. V. Iridoid glucosides from *Lamium album* and *Lamium maculatum* (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **2006,** 34, 88-91.
[32] Damtoft, S. Iridoid glucosides from *Lamium album*. *Phytochemistry* **1991,** 31, 175-178.
[33] Budzianowski, J., Skrzypczak, L. Phenylpropanoid esters from *Lamium album* flowers. *Phytochemistry* **1995,** 38, 997-1001.
[34] Pereira, O. R., Domingues, M. R. M., Silva, A. M. S., Cardoso, S. M. Phenolic constituents of *Lamium album*: focus on isoscutellarein derivatives. *Food Research International* **2012,** 48, 330-335.
[35] Savchenko, T., Blackford, M., Sarker, S. D., Dinan, L. Phytoecdysteroids from *Lamium* spp: Identification and distribution within plants. *Biochemical Systematics and Ecology* **2001,** 29, 891-900.
[36] Damtoft, S., Jensen, S. R. Hemialboside, a hemiterpene glucoside from *Lamium album*. *Phytochemistry* **1995,** 39, 923-924.
[37] Sarker, S. D., Dinan, L., Šik, V., Rees, H. H. 9ζ-O-β-D-glucopyranosyloxy-5-megastigmen-4-one from *Lamium album*. *Phytochemistry* **1997,** 45, 1431-1433.
[38] Eyde, R. Comprehending *Cornus*: puzzles and progress in the systematics of the dogwoods. *Botanical Review* **1988,** 54, 233-351.
[39] Angiosperm Phylogeny Group IV: Chase, M., Christenhusz, M., Fay, M., Byng, J., Judd, W., Soltis, D., Mabberley, D., Sennikov, A., Soltis, P., Stevens, P. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* **2016,** 181, 1-20.

[40] Ma, Q., Liu, X., Franks, R. G., Xiang, Q. J. Alterations of CorTFL1 and CorAP1 expression correlate with major evolutionary shifts of inflorescence architecture in *Cornus* (Cornaceae) - a proposed model for variation of closed inflorescence forms. *New Phytologist* **2017,** 216, 519-535.
[41] Xiang, Q.-Y., Manchester, S., Thomas, D., Zhang, W., Fan, C. Phylogeny, biogeography, and molecular dating of cornelian cherries (*Cornus*, Cornaceae): tracking tertiary plant migration. *Evolution* **2005,** 59, 1685-1700.
[42] Xiang, Q.-Y., Thomas, D., Zhang, W., Manchester, S., Murrell, Z. Species level phylogeny of the genus *Cornus* (Cornaceae) based on molecular and morphological evidence - implications for taxonomy and Tertiary intercontinental migration. *Taxon* **2006,** 55, 9-30.
[43] Xiang, Q.-Y., Thorne, J., Seo, T., Zhang, W., Thomas, D., Ricklefs, R. Rates of nucleotide substitution in Cornaceae (Cornales) - pattern of variation and underlying causal factors. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2008,** 49, 327-342.
[44] Rutkowski, L. *Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej*. 2 ed.; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 2011.
[45] Fournier, P. *Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France*. Vol. 2. Paul Lechevalier: Paryż, 1948.
[46] Kucharska, A. Z., Szumny, A., Sokół-Łętowska, A., Piórecki, N., Klymenko, S. V. Iridoids and anthocyanins in cornelian cherry (*Cornus mas* L.) cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* **2015,** 40, 95-102.
[47] Popović, B. M., Štajner , D., Slavko, K., Sandra, B. Antioxidant capacity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) - comparison between permanganate reducing antioxidant capacity and other antioxidant methods. *Food Chemistry* **2012,** 134, 734-741.
[48] Huang, J., Zhang, Y., Dong, L., Gao, Q., Yin, L., Quan, H., Chen, R., Fu, X., Lin, D. Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. *Journal of Ethnopharmacology* **2018,** 213, 280-301.
[49] Asgary, S., Kelishadi, R., Rafieian-Kopaei, M., Najafi, S., Najafi, M., Sahebkar, A. Investigation of the lipid-modifying and antiinflammatory effects of *Cornus mas* L. supplementation on dyslipidemic children and adolescents. *Pediatric Cardiology* **2013,** 34, 1729-35.
[50] Jayaprakasam, B., Olson, L. K., Schutzki, R. E., Tai, M. H., Nair, M. G. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006,** 54, 243-248.
[51] Sozański, T., Kucharska, A. Z., Szumny, A., Magdalan, J., Bielska, K., Merwid-Ląd, A., Woźniak, A., Dzimira, S., Piórecki, N., Trocha, M. The protective effect of the *Cornus mas* fruits (cornelian cherry) on hypertriglyceridemia and atherosclerosis through PPARalpha activation in hypercholesterolemic rabbits. *Phytomedicine* **2014,** 21, 1774-1784.
[52] He, K., Song, S., Zou, Z., Feng, M., Wang, D., Wang, Y., Li, X., Ye, X. The hypoglycemic and synergistic effect of loganin, morroniside, and ursolic acid isolated from the fruits of *Cornus officinalis*. *Phytotherapy Research* **2016,** 30, 283-291.
[53] Lin, M. H., Liu, H. K., Huang, W. J., Huang, C. C., Wu, T. H., Hsu, F. L. Evaluation of the potential hypoglycemic and Beta-cell protective constituents isolated from *Corni fructus* to tackle insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011,** 59, 7743-7751.
[54] Hatano, T., Ogawa, N., Kira, R., Yasuhara, T., Okuda, T. Tannins of Cornaceous plants. I. Cornusiins A, B and C, dimeric monomeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Cornus officinalis*, and orientation of valoneoyl group in related tannins. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1989a,** 37, 2083-2090.
[55] Hatano, T., Yasuhara, T., Okuda, T. Tannins of Cornaceous plants. II. Cornusiins D, E and F, new dimeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Cornus officinalis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1989b,** 37, 2665-2669.

[56] Okuda, T., Hatano, T., Ogawa, N. Cornusiin A, a dimeric ellagitannin forming four tautomers, and accompanying new tannins in *Cornus officinalis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1984,** 32, 4662-4665.
[57] Pawłowska, A. M., Camangi, F., Braca, A. Quali-quantitative analysis of flavonoids of *Cornus mas* L. (Cornaceae) fruits. *Food Chemistry* **2010,** 119, 1257-1261.
[58] Kucharska, A. Z. Związki aktywne owoców derenia (*Cornus mas* L.). Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław, 2012.
[59] Park, K. H., Yin, J., Yoon, K. H., Hwang, Y. J., Lee, M. W. Antiproliferative effects of new dimeric ellagitannin from *Cornus alba* in prostate cancer cells including apoptosis-related S-phase arrest. *Molecules* **2016,** 21, 137.
[60] Bruneton, J. *Pharmacognosy: Phytochemistry of Medicinal Plants*. Lavoisier: Paryż, 1999.
[61] Jensen, S. R., Franzyk, H., Wallander, E. Chemotaxonomy of the Oleaceae: Iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry* **2002,** 60, 213-231.
[62] Bate-Smith, E., Ferguson, I., Hutson, K., Jensen, S., Nielsen, B., Swain, T. Phytochemical interrelationships in the Cornaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* **1975,** 3, 79-89.
[63] Xiang, Q.-Y., Brunsfeld, S., Soltis, D., Soltis, P. Phylogenetic relationships in *Cornus* based on chloroplast DNA restriction sites; implications for biogeography and character evolution. *Systematic Botany* **1996,** 21, 515-534.
[64] Dinda, B., Debnath, S., Harigaya, Y. Naturally occurring iridoids. A review, part 1. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2007,** 55, 159-222.
[65] Dinda, B., Debnath, S., Harigaya, Y. Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. A review, part 2. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2007,** 55, 689-728.
[66] Dinda, B., Debnath, S., Banik, R. Naturally occurring iridoids and secoiridoids. An updated review, part 4. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2011,** 59, 803-833.
[67] Dinda, B., Chowdhury, D. R., Mohanta, B. C. Naturally occurring iridoids, secoiridoids and their bioactivity. An updated review, part 3. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2009,** 57, 765-796.
[68] Vogt, T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* **2010,** 3, 2-20.
[69] Kurkin, V. Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structural analysis, and biological activity. *Chemistry of Natural Compounds* **2003,** 39, 123-153.
[70] Ito, N., Nihei, T., Kakuda, R., Yaoita, Y., Kikuchi, M. Five new phenylethanoid glycosides from the whole plants of *Lamium purpureum* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2006,** 54, 1705-1708.
[71] Strzelecka, H., Kamińska, J., Kowalski, J., Malinowski, J., Walewska, E. *Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych*. PZWL: Warszawa, 1987.
[72] Amiot, M. J., Fleuriet, A., Macheix, J. J. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry* **1989,** 28, 67-69.
[73] Caruso, G., Gucci, R., Sifola, M. I., Selvaggini, R., Urbani, S., Esposto, S., Taticchi, A., Servili, M. Irrigation and fruit canopy position modify oil quality of olive trees (cv. Frantoio). *Journal of the Science and Food Agriculture* **2017,** 97, 3530-3539.
[74] Soler-Rivas, C., Espiń, J. C., Wichers, H. J. Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2000,** 80, 1013-1023.
[75] Deschauer, T. *Illustrated Phytotherapy. Book two. 1945*. Thos. Deschauer Publications. Dostęp (20.01.2016) http://www.swsbm.com/Ephemera/Deschauer-2.pdf. : Maywood, Ill., Vol. 2.
[76] Remigton, J. P., Woods, H. C. *The Dispensatory of the United States of America 1918*. 20th ed.; The Southwest School of Botanical Medicine. Dostęp (20.01.2016) http://www.swsbm.com/Dispensatory/USD-1918-complete.pdf.
[77] Yordanova, Z. P., Zhiponova, M. K., Iakimova, E. T., Dimitrova, M. A., Kapchina-Toteva, V. M. Revealing the reviving secret of the white dead nettle (*Lamium album* L.). *Phytochemistry Reviews* **2014,** 13, 375-389.

[78] Quade, M. J., Roth, J. A. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **1997,** 58, 239-248.
[79] Sato, T., Hongu, T., Sakamoto, M., Funakoshi, Y., Kanaho, Y. Molecular mechanisms of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced superoxide generation and degranulation in mouse neutrophils: phospholipase D is dispensable. *Molecular and Cellular Biology* **2013,** 33, 136-145.
[80] Jaken, S. Protein kinase C isozymes and substrates. *Current Opinion in Cell Biology* **1996,** 8, 168-173.
[81] Palsson-McDermott, E. M., O'Neill, L. A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* **2004,** 113, 153-162.
[82] Koca, U., Suntar, I., Akkol, E. K., Yilmazer, D., Alper, M. Wound repair potential of *Olea europaea* L. leaf extracts revealed by in vivo experimental models and comparative evaluation of the extracts' antioxidant activity. *Journal of Medicinal Food* **2011,** 14, 140-146.
[83] Deng, J. H., Zou, S. I. Observation on TCM treatment of 32 cases of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Journal of Traditional Chinese Medicine* **2007**, 21.
[84] Han, Y. X., Liang, D., Han, X. R., Liang, D. Y. Comparative analysis of the influence of Fructus Ligustri lucidi on a rat lumbar disc herniation model. *Molecular Medicine Reports* **2015,** 12, 1225-32.
[85] Farmakopea Polska IX. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych: Warszawa, 2011.
[86] Farmakopea Europejska (Ph. Eur.) 8.0. Rada Europy: Strasburg, 2014.
[87] Farmakopea Polska X. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych: Warszawa, 2014.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

a) działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Swoją działalność naukową rozpoczęłam w studenckich kołach naukowych przy Zakładzie Bromatologii oraz Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii Akademii Medycznej w Warszawie, co wiązało się z moimi zainteresowaniami z pogranicza dietetyki i fitoterapii. W ramach tej działalności uczestniczyłam w warsztatach archeologii doświadczalnej, w czasie których realizowany był temat żywienia dawnej populacji słowiańskiej.

Badania w ramach pracy magisterskiej prowadziłam w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii. Zajmowałam się analizą składu chemicznego oraz określeniem wpływu ekstraktów z owoców ligustra pospolitego na aktywność konwertazy angiotensynowej (ACE) i obojętnej endopeptydazy (NEP). Część tych badań została opisana w publikacji **O1**. Okazało się, że spośród badanych części ligustra, ekstrakty wodne z liści najsilniej hamowały aktywność enzymów. W związku z tym poszukiwanie kierunku działania wyciągu wodnego z liści ligustra było przedmiotem dalszych badań na modelu przeciwzapalnym ludzkich neutrofili. Wykazano, że wyciąg z liści w najwyższym badanym stężeniu znacząco hamuje uwalnianie markerów stanu zapalnego. Wpływ wyciągu wodnego na sekrecję RFT, MPO, elastazy, IL-8 oraz MMP-9 przez granulocyty obojętnochłonne indukowane f-MLP i cytochalazyną B, PMA lub LPS opisano w pracy **O5** oraz prezentowano na konferencjach naukowych w formie plakatów **KP8 i KP13,** a także podczas wystąpienia ustnego **KW1**.

Podczas prac naukowo-badawczych przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora brałam udział w badaniach prowadzonych w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii WUM, m. in. w określeniu aktywności antyoksydacyjnej penta-*O*-galoilo-β-D-glukozy. Wyniki badań zostały zamieszczone w artykule **O2** oraz zaprezentowane na konferencji naukowej **KP3**. Penta-*O*-galoilo-β-D-glukoza jest związkiem polifenolowym występującym w nasionach wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa* Hudziok). W pracy przeglądowej **R1** opisano jej potencjalne właściwości przeciwzapalne, przeciwnowotworowe i przeciwcukrzycowe. Ponadto brałam udział w badaniach prowadzonych przez dr. hab. Sebastiana Granicę. W pracy tej określiłam aktywność antyoksydacyjną ekstraktów metanolowych z części nadziemnych wiesiołka dwuletniego (*Oenothera biennis* L.) i wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa* Hudziok). Efekty tych badań opisano w artykule **O4** i prezentowano w formie plakatu na konferencji międzynarodowej **KP10**. Ponadto dalsza współpraca z dr. hab. Sebastianem Granicą dotyczyła badania wpływu flawonoidów wyizolowanych z ziela rdestu ptasiego (*Polygonum aviculare* L.) na produkcję RFT przez ludzkie neutrofile. Wyniki tych doświadczeń opublikowano w pracy **O7** oraz zaprezentowano na konferencji międzynarodowej w formie plakatu **KP15**.

Przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej było przede wszystkim badanie oraz analiza porównawcza właściwości związków wyizolowanych z liści ligustra pospolitego – oleuropeiny i oleaceiny. Oba związki pierwotnie zostały zidentyfikowane w liściach i owocach oliwki. Dotychczas wiele uwagi poświęcono badaniu aktywności oleuropeiny. Dopiero z czasem wskazano, że w oliwie, która jest najczęściej stosowana, występuje przede wszystkim oleaceina oraz hydroksytyrozol, natomiast oleuropeina występuje w nieprzetworzonych substancjach roślinnych. Dlatego celem moich badań była ocena potencjalnej roli oleaceiny jako składnika oliwy w łagodzeniu procesów zapalnych leżących u podstaw chorób układu sercowo-naczyniowego, m. in. miażdżycy. Tym bardziej, że ilość badań dotyczących oleaceiny wciąż jest ograniczona ze względu na brak ogólnodostępnej substancji wzorcowej. Pierwszym etapem prac związanych z rozprawą doktorską było przygotowanie przeglądu piśmiennictwa dotyczącego aktywności biologicznej oleuropeiny i oleaceiny. Opracowany materiał został opublikowany w formie pracy przeglądowej **R2** w polskim czasopiśmie.

Prowadząc prace doświadczalne związane z rozprawą doktorską w pierwszej kolejności skupiłam się na ocenie aktywności przeciwutleniającej oleuropeiny i oleaceiny w układach bezkomórkowych i komórkowych. Wyniki badań bezkomórkowych pokazały, że oleaceina silnie wymiata HClO, podczas gdy oleeuropeina jest nieaktywna. Zarówno oleuropeina jak i oleaceina stosunkowo słabo wymiatały $\cdot O_2^-$ i H_2O_2, natomiast dość silnie - reaktywne formy azotu ($\cdot NO$, $ONOO^-$). Wstępne badania określające wpływ oleaceiny i oleuropeiny na produkcję reaktywnych form tlenu i uwalnianie MPO przez neutrofile wykazały, że oleaceina jest silniejszym inhibitorem produkcji RFT i uwalniania MPO niż oleuropeina. Oceniłam także wpływ na uwalnianie tlenku azotu na modelu ludzkich monocytów. W badaniach tych wskazałam, że oleaceina jako przeciwutleniacz i inhibitor sekrecji MPO może odgrywać rolę protekcyjną w przebiegu chorób układu sercowo-naczyniowego, głównie miażdżycy. Wyniki tych badań stały się przedmiotem publikacji **O3** oraz były wielokrotnie prezentowane jako

doniesienia zjazdowe **KP1**, **KP2**, **KP4**, **KP5**, **KP6** i **KP7**. Ponadto brałam udział w pracach prowadzonych przez dr. Andrzeja Parzonko, związanych z porównaniem wpływu oleaceiny i oleuropeiny na funkcje progenitorowych komórek endotelialnych, których wyniki zostały opublikowane w pracy **O6** oraz zaprezentowane w formie wykładu **KW3**.

Efektem współpracy z prof. Hans'em-Wilhelm'em Rauwald'em z Uniwersytetu w Lipsku była praca **O8**, w której opisano wpływ oleaceiny i oleuropeiny na aktywność laktoperoksydazy, odgrywającej rolę w infekcjach bakteryjnych i stanach zapalnych.

Celem dalszych badań realizowanych w ramach grantu przyznanego w konkursie PRELUDIUM przez Narodowe Centrum Nauki [**P1**] było porównanie wpływu oleuropeiny i oleaceiny na funkcje neutrofili w warunkach *in vitro*. Oceniłam wpływ związków na etapy procesu zapalnego, takie jak uwalnianie elastazy i MMP-9, IL-8 oraz wpływ na ekspresję białek adhezyjnych (CD 18 i CD 62L), które sprzyjają przyleganiu neutrofili do komórek śródbłonka naczyniowego. Oznaczyłam stopień hamowania aktywności NEP na powierzchni stymulowanych neutrofili i potwierdziłam, że oleuropeina nie jest aktywna. W swoich badaniach próbowałam odpowiedzieć na pytanie, czy powyższe związki, a zwłaszcza oleaceina, potęgują działanie peptydów natriuretycznych BNP i ANP. Przeprowadziłam ocenę jednoczesnego wpływu peptydów natriuretycznych i oleaceiny na sekrecję wybranych markerów stanu zapalnego (elastaza, MMP-9, IL-8). Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy **O9** oraz były przedmiotem prezentacji podczas konferencji krajowych i zagranicznych **KP5**, **KP7**, **KP11**, **KP12**, **KP14** i **KP16**. Ostatecznie wywnioskowałam, że oleaceina, jako jeden z głównych składników oliwy, wykazuje znaczną aktywność antyoksydacyjną, a w mniejszym stopniu hamuje uwalnianie markerów stanu zapalnego. Podsumowanie prac związanych z rozprawą doktorską zaprezentowałam w formie wykładu **KW2, KW4 i KW5** podczas konferencji krajowych i minisympozjum zagranicznego.

Wyniki tych badań stały się podstawą poszukiwań modelu, który pozwoliłby na ocenę skuteczności oleaceiny w łagodzeniu lub zapobieganiu chorób układu sercowo-naczyniowego o podłożu zapalnym. W związku z tym we współpracy z dr Agnieszką Filipek rozpoczęłam badania wstępne na modelu *ex vivo* ludzkiej płytki miażdżycowej pobranej od pacjentów po zabiegu endarterektomii. Wykazałam, że oleaceina w zakresie stężeń 5 – 20 μM hamuje indukowaną LPS produkcję MPO i MMP-9 przez komórki wchodzące w skład płytki miażdżycowej. Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w formie plakatów na konferencjach międzynarodowych **KP6** i **KP9**.

W ramach współpracy z dr Martą Włodarczyk i dr Małgorzatą Wrzosek z Zakładu Biochemii i Farmakogenomiki WUM zajmowałam się oceną wpływu kwasu chlorogenowego jako dominującego składnika soku jabłkowego na sekrecję MMP-9 przez ludzkie neutrofile. Praca ta była prezentowana w formie posterowej na konferencji międzynarodowej **KP17**.

b) działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Ze względu na szeroki zakres badań biologicznych dotyczących właściwości oleaceiny zaistniała potrzeba opracowania metody izolacji tego związku zapewniającej wysoką wydajność tego procesu. Dlatego po uzyskaniu stopnia doktora zajęłam się oznaczeniem ilościowym sekoirydoidów

i fenylopropanoidów w ekstraktach wodnych z liści ligustra pospolitego. Wyniki tych prac zostały zaprezentowane w formie plakatów na konferencjach krajowych i międzynarodowych **KP18**, **KP19** i **KP22**. Ponadto rozpatrywałam podobieństwa i różnice składu chemicznego oraz aktywności biologicznej wyciągów z kwiatów, liści, owoców i nasion ligustra. Rezultaty tych analiz były przedmiotem prezentacji plakatowej **KP24**. Wyniki badań nad aktywnością oleaceiny, które były podstawą rozprawy doktorskiej zainicjowały cykl prac w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii WUM pod kierownictwem prof. Marka Naruszewicza. Ich celem było poszukiwanie mechanizmu działania tego związku odpowiedzialnego za potencjalne działanie przeciwmiażdżycowe. Wraz z dr Agnieszką Filipek przeprowadziłam badania na modelach ludzkich monocytów/makrofagów oraz płytki miażdżycowej *ex vivo*. Ich wynikiem było stwierdzenie, że oleaceina powoduje wzrost ekspresji receptora CD163 na powierzchni monocytów/makrofagów, sekrecji przeciwzapalnej cytokiny IL-10 oraz spadek sekrecji białka HMGB-1 (*high-mobility group box-1*) przez komórki płytki miażdżycowej. Wyniki tych badań zaowocowały publikacjami **O10** i **O11**, które zostały poprzedzone zgłoszeniami patentowymi w Polsce, Unii Europejskiej i Stanach Zjednoczonych. Ponadto zostały zaprezentowane w formie plakatów **KP20** i **KP21** na konferencji międzynarodowej. Podsumowanie dotychczasowych osiągnięć z zakresu prac naukowo-badawczych nad pozyskaniem i aktywnością oleaceiny prezentowałam w formie wykładów **KW7** i **KW8**. W pracy przeglądowej **R4** dokonałam przeglądu literatury na temat badań dotyczących oleaceiny.

Uczestniczyłam również w pracach związanych z przygotowaniem przeglądu literatury dotyczącej składu i udokumentowanego działania substancji roślinnych należących do rodzaju wierzbówka/wierzbownica (*Epilobium*). W przygotowanej przez dr. hab. Sebastiana Granicę publikacji **R3** opracowałam zagadnienia dotyczące udokumentowanego działania przeciwutleniającego i przeciwzapalnego substancji roślinnych opisywanego rodzaju.

Jako wykonawca projektu realizowanego przez prof. Annę Kiss w ramach grantu w konkursie Opus przyznanego przez NCN [**P4**], uczestniczyłam w pracach związanych z analizą składu chemicznego i badaniem aktywności związków wyizolowanych z kwiatów lilaka pospolitego (*Syringa vulgaris* L.). Otrzymane rezultaty opisano w pracy **O12** oraz prezentowano w formie plakatu **KP25**.

W ramach współpracy z prof. Matthiasem Melzig'em przeprowadziłam badania wstępne dotyczące zdolności hamowania uwalniania cytokin przez wybrane gatunki z rodziny Asteraceae, takie jak *Achillea ptarmica*, *Anacyclus pyrtehrum* czy *Acmella ciliata*, na modelu komórek linii THP-1. Badania te były następnie kontynuowane i zaprezentowane podczas konferencji międzynarodowej **KP26**.

Jako wykonawca projektu finansowanego przez NCN [**P5**] współpracowałam z dr. hab. Sebastianem Granicą. Podczas realizacji projektu zajmowałam się badaniem aktywności procyjanidyn wyizolowanych z kwiatów lipy drobnolistnej (*Tilia cordata* Mill.). Określiłam ich potencjał hamujący sekrecję cytokin prozapalnych (IL-8, TNF-α) przez ludzkie neutrofile stymulowane LPS. Praca ta zaowocowała publikacją **O13** oraz prezentacją posterową **KP28**. Ponadto wykonałam badania aktywności flawonoidów wyizolowanych z części naziemnych *Corispermum marschallii*, które zostały opisane w artykule **O14**.

Badania dotyczące izolacji i badania aktywności związków ziela jasnoty białej (*Lamium album* L.) podjęłam w związku z otrzymanym grantem w ramach programu badań naukowych i prac służących rozwojowi młodych naukowców WUM [**P2**]. Wstępne wyniki zaprezentowałam jako doniesienia zjazdowe w formie ustnej **KW6** i plakatowej **KP27**. Obecnie we współpracy z dr hab. Agnieszką Bazylko prowadzone są badania dotyczące oznaczeń ilościowych dominujących składników ekstraktu etanolowego z ziela jasnoty białej.

W ostatnim czasie w swojej pracy skupiłam się na poszukiwaniu inhibitorów enzymów trawiennych, α-amylazy i lipazy trzustkowej w wybranych substancjach roślinnych. Prace te są związane z realizacją otrzymanego grantu w ramach konkursu Sonata finansowanego przez NCN [**P3**]. Wstępne wyniki, zaprezentowane w formie plakatów **KP29** i **KP30**, pozwoliły na wybranie do dalszych badań substancji roślinnych pozyskanych z kilku gatunków (*Chaenomeles japonica*, *Hippophaë rhamnoides*, *Hibiscus sabdariffa*). Oprócz prowadzonej izolacji związków z owoców derenia białego (*Cornus alba* L.), rozpoczęłam prace dotyczące badania aktywności przeciwzapalnej wyselekcjonowanych substancji roślinnych na modelu linii komórkowej Caco2.

6. Pozostałe opublikowane prace oryginalne

O1. Kiss A.K., Mańk M., Melzig M. Dual inhibition of metallopeptidases ACE and NEP by extracts, and iridoids from *Ligustrum vulgare* L. *Journal of Ethnopharmacology* 2008, 120: 220-225 **(IF_{2008} - 2,260, MNiSW – 32 pkt.)**

O2. Kiss A.K., Filipek A., Czerwińska M., Naruszewicz M. *Oenothera paradoxa* defatted seeds extracts and its bioactive component penta-*O*-galloyl-β-D-glucose decreased production of reactive oxygen species and inhibited release of leukotriene B_4, interleukin-8, elastase and myeloperoxidase in human neutrophils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010, 58: 9960-9966 **(IF_{2010} - 2,816; MNiSW - 32)**

O3. Czerwińska M., Kiss A.K., Naruszewicz M. A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. *Food Chemistry* 2012, 131: 940-947 **(IF_{2012} - 3,334; MNiSW – 45 pkt.)**

O4. Granica S., Czerwińska M.E., Piwowarski J.P., Ziaja M., Kiss A.K. 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* 2013, 61: 801-810 **(IF_{2013} - 3,107; MNiSW – 40 pkt.)**

O5. Czerwińska M.E., Granica S., Kiss A.K. Effects of an aqueous extract from leaves of *Ligustrum vulgare* on mediators of inflammation in a human neutrophils model. *Planta Medica*; 2013, 79: 924-932 **(IF_{2013} - 2,339; MNiSW – 25 pkt.)**

O6. Parzonko A., Czerwińska M.E., Kiss A.K., Naruszewicz M. Oleuropein and oleacein may restore biological functions of endothelial progenitor cells impaired by angiotensin II via activation of

Nrf2/heme oxygenase-1 pathway. *Phytomedicine* 2013, 20:1088-1094 **(IF_{2013} - 2,877; MNiSW – 35 pkt.)**

O7. Granica S., Czerwińska M.E., Żyżyńska-Granica B., Kiss A.K. Antioxidant and anti-inflammatory flavonol glucuronides from *Polygonum aviculare* L. *Fitoterapia* 2013, 91: 180-188 **(IF_{2013} - 2,231; MNiSW – 25 pkt.)**

O8. Flemmig J., Rusch D., Czerwińska M.E., Rauwald H.W., Arnhold J. Components of a standardised olive leaf dry extract (Ph. Eur.) promote hypothiocyanite production by lactoperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2014, 549:17-25 **(IF_{2014} - 3,017; MNiSW – 30 pkt.**)

O9. Czerwińska M.E., Kiss A.K., Naruszewicz M. Inhibition of human neutrophils NEP activity, CD11b/CD18 expression and elastase release by 3,4-dihydroxyphenylethanol-elenolic acid dialdehyde, oleacein. *Food Chemistry* 2014, 153: 1-8 **(IF_{2014} - 3,391; MNiSW – 40 pkt.)**

O10. Filipek A., Czerwińska M.E., Kiss A.K., Wrzosek M., Naruszewicz M. Oleacein enhances anti-inflammatory activity of human macrophages by increasing CD163 receptor expression. *Phytomedicine* 2015, 22: 1255-1261 **(IF_{2015} - 2,937; MNiSW – 40 pkt.)**

O11. Filipek A., Czerwińska M.E., Kiss A.K., Polański J.A., Naruszewicz M. Oleacein may inhibit destabilization of carotid plaques from hypertensive patients. Impact on high mobility group protein-1. *Phytomedicine* 2017, 32: 68-73 (**IF_{2017} - 3,61; MNiSW – 40 pkt.**)

O12. Dudek M.K., Michalak B., Woźniak M., Czerwińska M.E., Filipek A., Granica S., Kiss A.K. Hydroxycinnamoyl derivatives and secoiridoid glycoside derivatives from *Syringa vulgaris* flowers and their effects on the pro-inflammatory responses of human neutrophils. *Fitoterapia* 2017, 121: 194-205 (**IF_{2017} - 2,642; MNiSW – 30 pkt.**)

O13. Czerwińska M.E., Dudek M.K., Pawłowska K.A., Pruś A., Granica S. The influence of procyanidins isolated from small-leaved lime flowers (*Tilia cordata* Mill.) on human neutrophils. *Fitoterapia* 2018, 127: 115-122 (**IF_{2017} - 2,642; MNiSW – 30 pkt.**)

O14. Pawłowska K., Czerwińska M.E., Wilczek M., Strawa J., Tomczyk M., Granica S. Anti-inflammatory potential of flavonoids from the aerial parts of *Corispermum marschallii*. *Journal of Natural Products* 2018, 81:1760-1768 (**IF_{2017} - 3,885; MNiSW – 35 pkt.**)

7. Pozostałe opublikowane prace przeglądowe

R1. Czerwińska M., Granica S., Kiss A.K. Penta-*O*-galoilo-β-D-glukoza – nie tylko antyoksydant. Potencjalne działanie przeciwzapalne, przeciwnowotworowe i przeciwcukrzycowe. *Czynniki Ryzyka* 2009, 4: 57-64 **(MNiSW - 6 pkt.)**

R2. Czerwińska M. Oleoeuropeina i jej dialdehydowa pochodna jako główne składniki aktywne oliwki europejskiej (*Olea europaea* L.). *Czynniki Ryzyka* 2010, 2: 42-49 **(MNiSW - 6 pkt.)**

R3. Granica S., Piwowarski J.P., Czerwińska M.E., Kiss A.K. Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): A review. *Journal of Ethnopharmacology* 2014, 156: 316–346 (**IF_{2014} - 2,998; MNiSW – 35 pkt.**)

R4. Naruszewicz M., Czerwińska M.E., Kiss A.K. Oleacein. Translation from Mediterranean diet to potential antiatherosclerotic drug. *Current Pharmaceutical Design* 2015, 21:1205-1212 (**IF_{2015} - 3,052; MNiSW – 35 pkt.**)

8. Udział w krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych

Prezentacje plakatowe

KP1. Czerwińska M., Kiss A.K., Naruszewicz M. A comparative study of the effects of oleuropein and its dialdehydic form (oleacein) on human neutrophil oxidative burst. 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 28.08-2.09.2010, Berlin, Niemcy (*Planta Medica*, 2010, 76: P275)

KP2. Czerwińska M., Kiss A.K., Naruszewicz M. Oleoeuropeina i jej dialdehydowa pochodna (oleaceina)-porównanie aktywności antyoksydacyjnej. XXI Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, 12.09-15.09.2010, Gdańsk, Polska

KP3. Kiss A.K., Filipek A., Czerwińska M., Naruszewicz M. Efekt przeciwzapalny penta-*O*-galoilo-beta-D-glukozy – wpływ na funkcje ludzkich neutrofili. XXI Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, 12.09-15.09.2010, Gdańsk, Polska

KP4. Czerwińska M., Kiss A.K., Naruszewicz M. A comparative study of the effects of oleuropein and its dialdehydic form (oleacein) on human neutrophil oxidative burst and monocytes nitric oxide production. 79th European Atherosclerosis Society Congress, 26.06-29.06.2011, Geteborg, Szwecja (*Atherosclerosis Supplements*, 2011, 12(1):142-142/677)

KP5. Czerwińska M., Kiss A.K., Naruszewicz M. Porównanie wpływu oleoeuropeiny oraz jej pochodnej oleaceiny na aktywność obojętnej endopeptydazy (NEP), generowanie reaktywnych form tlenu oraz inne funkcje ludzkich neutrofili. XIV Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Badań nad Miażdżycą, 9.12-10.12.2011, Kraków, Polska

KP6. Czerwińska M., Kiss A.K., Naruszewicz M. Oleacein from virgin olive oil may contribute to stabilization of atherosclerotic plaques by decrease myeloperoxidase release from neutrophils. 80th European Atherosclerosis Society Congress (EAS 2012), 25.05-28.05.2012, Mediolan, Włochy

KP7. Czerwińska M, Kiss AK, Naruszewicz M. A comparison of the effects of oleuropein and its derivative from olive oil, oleacein, on functions of human neutrophils. 8th Joint Natural Product Conference (8th Joint Meeting with AFERP, ASP, GA, PSE and SIF), 28.07-1.08.2012, Nowy Jork, USA (*Planta Medica*, 2012; 78(11): 1205-1205/PI271)

KP8. Czerwińska M., Granica S., Kiss A.K. Effect of aqueous extracts from *Ligustrum vulgare* L. on ROS production and other functions of human neutrophils. 8th Joint Natural Product Conference (8th Joint Meeting with AFERP, ASP, GA, PSE and SIF**)**, 28.07-1.08.2012, Nowy Jork, USA (*Planta Medica*, 2012; 78(11): 1122-1122/PF39)

KP9. Czerwińska M., Filipek A., Kiss A.K., Polański J.A., Proczka R.M., Białek P., Naruszewicz M. Oleacein from olive oil inhibits myeloperoxidase and metalloproteinase-9 production by atherosclerotic plaque. 8th Joint Natural Product Conference (8th Joint Meeting with AFERP, ASP, GA, PSE and SIF**)**, 28.07-1.08.2012, Nowy Jork, USA (*Planta Medica*, 2012; 78(11): 1206-1206/PI273)

KP10. 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's extracts. 8th Joint Natural Product Conference (8th Joint Meeting with AFERP, ASP, GA, PSE and SIF**)**, 28.07-1.08.2012, Nowy Jork, USA (*Planta Medica*, 2012; 78(11): 1205-1205/PI268)

KP11. Czerwińska M, Kiss AK, Naruszewicz M. A comparison of the effects of oleuropein and its derivative from olive oil, oleacein, on functions of human neutrophils. 2nd International Conference and Workshop "Plant – the source of research material", 18.10-20.10.2012, Lublin, Polska

KP12. Czerwińska M.E., Kiss A.K., Naruszewicz M. The effect of oleuropein and its derivative oleacein on the expression of adhesion molecules on the surface of human neutrophils. 17th International Congress "Phytopharm 2013", 8.07-10.07.2013, Wiedeń, Austria

KP13. Grzelak J., Czerwińska M., Piwowarski J., Kiss A.K. Comparison of chemical composition and effects on human neutrophils of aqueous and ethanolic extracts from *Ligustrum vulgare* L. 17th International Congress "Phytopharm 2013", 8.07-10.07.2013, Wiedeń, Austria

KP14. Czerwińska M.E., Kiss A.K., Naruszewicz M. Effect of oleacein, polyphenol of olive oil, with natriuretic peptides on the functions of human neutrophils. 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plants and Natural Product Research (GA 2013), 1.09-5.09.2013, Münster, Niemcy (*Planta Medica*, 2013; 79(13): 1212-1212 (PJ11)

KP15. Granica S., Czerwińska M.E., Żyżyńska-Granica B., Kiss A.K. New acetylated flavonol glucuronides isolated from *Polygoni avicularis herba* and their influence on some neutrophils' functions. 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plants and Natural Product Research (GA 2013), 1.09-5.09.2013, Münster, Niemcy (*Planta Medica*, 2013; 79(13): 1214-1214/PJ17)

KP16. Czerwińska M.E., Kiss A.K., Naruszewicz M. Wpływ oleuropeiny na funkcje ludzkich neutrofili. XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, 18.09-21.09.2013, Białystok, Polska

KP17. Włodarczyk M., Czerwińska M., Wrzosek M., Świeca M, Nowicka G. The effect of apple juice rich in chlorogenic acid on MMP-9 secretion by LPS-stimulated neutrophils – preliminary report. 20th International Congress of Nutrition, 15.09-20.09.2013, Granada, Hiszpania (*Annals of Nutrition & Metabolism*, 2013; 63(Supl.1): 310-310/PO112)

KP18. Czerwińska M., Ziarek M., Bazylko A., Osińska E., Kiss A. Determination of secoiridoids and phenylpropanoids in different extracts of *Ligustrum vulgare* L. leaves by HPTLC and HPLC-DAD-MS methods. 9th International Symposium on Chromatography of Natural Products, 26.05-29.05.2014, Lublin, Polska

KP19. Czerwińska M., Ziarek M., Bazylko A., Osińska E., Kiss A. HPTLC analysis of secoiridoids and phenylpropanoids in deifferent extracts of *Ligustrum vulgare* L. leaves. International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography, 2.07-4.07.2014, Lyon, Francja

KP20. Naruszewicz M., Filipek A., Czerwińska M., Polański J.A., Wrzosek M. Oleacein possess ability to protect carotid plaque against destabilization - impact on macrophages phenotype. American Heart Association, American Stroke Association International Stroke Conference , State of the Science Stroke Nursing Symposium. 11.02.2015-13.02.2015, Nashville, USA (*Stroke*, 2015, 46(Supl.1): AWP394)

KP21. Filipek A., Czerwińska M.E., Kiss A.K., Naruszewicz M. Oleacein. Translation from Mediterranean diet to protection of atherosclerotic plaque. 17th International Congress on Atherosclerosis (ISA 2015), 23.05-26.05.2015, Amsterdam, Holandia

KP22. Kiss A.K., Czerwińska M.E., Duszak K., Parzonko A. A comparative study on the protective effect on human fibroblast cell line NHDF of *Olea europaea* and *Ligustrum vulgare* leaves extracts. 63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA 2015), 23.08-27.08.2015, Budapeszt, Węgry (*Planta Medica*, 2015, 81(16): 1499-1500/PW-24)

KP23. Czerwińska M.E., Świerczewska A., Woźniak M., Kiss A.K. Preliminary separation of compounds from aerial parts of *Lamium album* and determination of phenolics-rich fractions activity in neutrophils. 10th International Symposium on Chromatography of Natural Products (ISCNP 2016) , 6.06-9.06.2016, Lublin, Polska

KP24. Czerwińska M.E., Warowny M., Kiss A.K. HPLC-DAD-MS analysis of extracts from flowers, leaves, fruits and branches of *Ligustrum vulgare* and their effect on cytokines secretion by human neutrophils. 9th Joint Natural Product Conference (9th Joint Meeting with AFERP, ASP, GA, PSE and SIF**)**, 24.07-27.07.2016, Kopenhaga, Dania (*Planta Medica*, 2016, 82(1): P382)

KP25. Woźniak M., Psyk K., Biernat M., Czerwińska M.E., Kiss A.K. Effects of extracts from leaves and flowers from *Syringa vulgaris* on mediators of inflammation in a human neutrophils model. 9th Joint Natural Product Conference (9th Joint Meeting with AFERP, ASP, GA, PSE and SIF**)**, 24.07-27.07.2016, Kopenhaga, Dania (*Planta Medica*, 2016, 82(1): P163)

KP26. Michalak B., Czerwińska M.E., Kiss A.K. Potential anti-inflammatory activity of selected plants from Asteraceae family in *in vitro* models. 9th Joint Natural Product Conference (9th Joint Meeting with AFERP, ASP, GA, PSE and SIF**)**, 24.07-27.07.2016, Kopenhaga, Dania (*Planta Medica*, 2016, 82(1): P176)

KP27. Czerwińska M., Świerczewska A., Granica S. The active constituents of *Lamium album* as inhibitors of cytokines secretion in human neutrophils. 65th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), 3.09-7.09.2017, Bazylea, Szwajcaria (*Planta Medica International Open*, 2017, 4(S 01): S1-S202)

KP28. Czerwińska M., Pawłowska K., Dudek M., Pruś A., Granica S. Bazylea. Anti-inflammatory activity of procyanidins isolated from *Tiliae flos*. 65th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA 2017), 3.09-7.09.2017, Bazylea, Szwajcaria (*Planta Medica International Open*, 2017, 4(S 01): S1-S202)

KP29. Czerwińska M.E., Siegień J., Granica S., Buchholz T., Melzig M.F. The screening of anti-lipase and anti-amylase activity of selected edible plant materials. 11th International Symposium on Chromatography of Natural Products (ISCNP 2018), 4.06-7.06.2018, Lublin, Polska

KP30. Czerwińska M.E., Świerczewska A., Buchholz T., Melzig M.F. *Cornus mas* and *Cornus alba* fruits - the comparative study of α-amylase and pancreatic lipase inhibitory effects. 66th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA 2018), 26.08-29.08.2018, Szanghaj, Chiny

Prezentacje ustne

KW1. Kiss A.K., Czerwińska M. Wpływ wyciągu wodnego z liści ligustra (*Ligustrum vulgare* L.) na mediatory stanu zapalnego na modelu ludzkich neutrofili. XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, 18.09-21.09.2013, Białystok, Polska

KW2. Czerwińska M.E., Kiss A.K., Naruszewicz M. The effect of oleuropein and its derivative oleacein on the functions of human neutrophils. XV Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Badań nad Miażdżycą, 17.10-20.10.2013, Krąg, Polska (*Czynniki Ryzyka*, 2013, 2: 53-53)

KW3. Parzonko A., Czerwińska M.E., Kiss A.K., Naruszewicz M. Protective effect of oleuropein and oleacein on biological functions of EPC impaired by angiotensyn II. XV Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Badań nad Miażdżycą, 17.10-20.10.2013, Krąg, Polska (*Czynniki Ryzyka*, 2013, 2: 55-55)

KW4. Czerwińska M.E. Porównanie wpływu oleuropeiny i jej dialdehydowej pochodnej oleaceiny na funkcje ludzkich neutrofili. VI Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, 20.12.2013, Warszawa, Polska

KW5. Czerwińska M. Effects of secoiridoids on selected functions of neutrophils. Mini-sympozjum, 6.03-8.03.2015, Berlin, Niemcy

KW6. Czerwińska M.E., Kiss A.K. The preliminary study searching a potential activity of *Lamium album* extracts as a background for their traditional use. 63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), 23.08-27.08.2015, Budapeszt, Węgry, SL5B_04 (*Planta Medica*, 2015, 81(16): 1415-1415/SL5B-04)

KW7. Czerwińska M.E., Filipek A., Kiss A.K., Naruszewicz M. Oleaceina jako składnik oliwy w prewencji powikłań miażdżycy. Trends in Dietetics 2017, 4.11.2017, Łódź, Polska

KW8. Czerwińska M.E., Filipek A., Kiss A.K., Naruszewicz M. Oleaceina jako składnik oliwy w prewencji powikłań miażdżycy. X Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, 15.12.2017, Warszawa, Polska

9. Współpraca naukowa

W1. współpraca z Katedrą Roślin Warzywnych i Leczniczych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (prof. Ewa Osińska) w zakresie zbioru i identyfikacji substancji roślinnych
W2. współpraca z Pharmazeutische Biologie, Universität Leipzig (prof. Hans-Wilhelm Rauwald) w zakresie badania wpływu sekoirydoidów z liści oliwki na aktywność laktoperoksydazy;
W3. współpraca z Institut für Pharmazie/Pharmazeutische Biologie, Freie Universität Berlin (prof. Matthias Melzig) w zakresie poszukiwania inhibitorów enzymów trawiennych oraz analizy chemicznej składników owoców z rodzaju *Cornus*;
W4. współpraca z Zakładem Farmakognozji, Uniwersytet Medyczny w Łodzi (dr hab. Monika Olszewska) w zakresie badania zdolności hamowania aktywności trzustkowych enzymów trawiennych;
W5. współpraca z Katedrą i Zakładem Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie (dr hab. Krystyna Skalicka-Woźniak) w zakresie badania aktywności przeciwzapalnej izolowanych irydoidów i fenylopropanoidów;
W6. współpraca z Katedrą Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej (dr hab. Marta Mendel), Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie w zakresie badania metabolitów substancji roślinnych przez mikroflorę jelitową świń.

10. Udział w projektach badawczych

P1. 2011 - 2013 **kierownik projektu** „Porównanie wpływu oleoeuropeiny i jej dialdehydowej pochodnej oleaceiny na funkcje neutrofili"; projekt w ramach konkursu PRELUDIUM, Narodowe Centrum Nauki – 2011/01/N/NZ4/01157

P2. 2015 - 2016 **kierownik projektu** „Analiza fitochemiczna wyciągów z naziemnych części jasnoty białej (*Lamium album* L.) oraz ich wpływ na uwalnianie IL-8 i ekspresję powierzchniową CD62L i CD11b/CD18"; program badań naukowych i prac rozwojowych służących rozwojowi młodych naukowców, finansowanych w ramach działalności statutowej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego – FW25/PM31/15/15

P3. od 08.2017 **kierownik projektu** „Badanie roli wybranych przetworów roślinnych w ochronie bariery jelitowej na modelu ludzkich komórek jelita grubego Caco-2 w odniesieniu do prewencji zespołu metabolicznego"; projekt w ramach konkursu SONATA, Narodowe Centrum Nauki – 2016/23/D/NZ7/00958

P4. 2015 - 2016 **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 w ramach konkursu OPUS, Narodowe Centrum Nauki – 2015/17/B/NZ7/03086

P5. 2016 - 2017 **wykonawca projektu** „Badania fitochemiczne oraz ocena właściwości przeciwzapalnych i przeciwbakteryjnych wyciągów przygotowywanych z farmakopealnej substancji roślinnej kwiat lipy (*Tiliae flos*)"; projekt w ramach konkursu SONATA, Narodowe Centrum Nauki – 2015/17/D/NZ7/02641

P6. od 06.2018 **wykonawca projektu** „Preparat zawierający oleaceinę (OCL) – składnik aktywny oleju z oliwek - do stosowania zewnętrznego w stanach zapalnych skóry i błon śluzowych"; projekt w ramach konkursu realizowanego przez Centrum Transferu Technologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego IBAkteria Sp. z o.o./Synergia WUM Sp. z o. o.

11. Staże naukowe

N1. 13.10.2014 – 7.11.2014 Niemcy, Berlin, Wolny Uniwersytet w Berlinie Instytut Farmaceutyczny, dwutygodniowy staż naukowy pod opieką prof. Matthias'a Melzig'a

N2. 11.07.2016 – 22.07.2016 Niemcy, Berlin, Wolny Uniwersytet w Berlinie Instytut Farmaceutyczny, dwutygodniowy staż naukowy pod opieką prof. Matthias'a Melzig'a

N3. 5.12.2016 – 16.12.2016 Niemcy, Berlin, Wolny Uniwersytet w Berlinie Instytut Farmaceutyczny, dwutygodniowy staż naukowy pod opieką prof. Matthias'a Melzig'a

N4. 13.03.2017 – 24.03.2017 Austria, Innsbruck, Uniwersytet w Innsbrucku, Instytut Farmacji, dwutygodniowy staż naukowy pod opieką prof. Herman'a Stuppner'a w ramach programu MNiSW wymiany osobowej z Republiką Austrii

12. Nagrody i stypendia za działalność naukową

ST1. 2018 – nagroda specjalna zespołowa JM Rektora WUM za uzyskany patent nr US 9.682.056 B2: „Oleaceina jako inhibitor destabilizacji blaszki miażdżycowej"

ST2. 2018 - nagroda naukowa II stopnia JM Rektora WUM za współautorstwo publikacji dotyczącej oleaceiny jako substancji stabilizującej blaszkę miażdżycową u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym.

ST3. 2016 – nagroda naukowa II stopnia JM Rektora WUM za współautorstwo pracy:
„Oleacein enhances anti-inflammatory activity of human macrophages by increasing CD163 receptor expression"; Filipek A., Czerwińska M., Kiss A.K., Wrzosek M., Naruszewicz M.

ST4. 2015 – nagroda naukowa II stopnia JM Rektora WUM za współautorstwo prac:

- "Inhibition of human neutrophils NEP activity, CD11b/CD18 expression and elastase release by 3,4-dihydroxyphenylethanol-elenolic acid dialdehyde, oleacein"; Czerwińska M.E., Kiss A.K., Naruszewicz M.
- "Oleacein. Translation from Mediterranean diet to potential antiatherosclerotic drug"; Naruszewicz M., Czerwińska M.E., Kiss A.K.
- "Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different Epilobium species (Onagraceae): A review"; Granica S., Piwowarski J.P., Czerwińska M.E., Kiss A.K.

ST5. 2014 – III nagroda w sesji plakatowej podczas konferencji HPTLC 2014 w Lyonie (International Symposium for Thin-Layer Chromatography, 1.07-4.07.2014) za prezentację plakatową „HPTLC analysis of secoiridoids and phenylpropanoids in different extracts of *Ligustrum vulgare* L. leaves"

ST6. 2014 – zespołowa nagroda naukowa II stopnia JM Rektora WUM za współautorstwo cyklu publikacji dotyczących badania składu chemicznego oraz działania przeciwzapalnego i przeciwutleniającego wybranych substancji roślinnych bogatych w elagotanoidy, flawonoidy, fenylopropanoidy i sekoirydoidy.

ST7. 2013 - I nagroda w sesji plakatowej podczas konferencji Phytopharm 2013 w Wiedniu (17th International Congress "Phytopharm 2013", 8.07-10.07, 2013) za prezentację plakatową „The effect of oleuropein and its derivative oleacein on the expression of adhesion molecules on the surface of human neutrophils"

ST8. 2011 – zespołowa nagroda naukowa III stopnia JM Rektora WUM za badania nad wpływem polifenoli z wyciągu z wytłoków wiesiołka na funkcje ludzkich neutrofili

ST9. 2009/2010, 2010/2011, 2011/2012, 2012/2013 - Stypendium JM Rektora WUM dla najlepszych doktorantów za osiągnięcia naukowe

13. Kursy i szkolenia

S1. 03.2018 Szkolenie „Rekrutacja krok po kroku, czyli jak prawidłowo przeprowadzić proces rekrutacji na studia wyższe", Optima - Centrum Rozwoju i Kształcenia Kadr, Gdańsk

S2. 04.2012 Kurs cytometrii przepływowej, Pracownia Cytometrii Przepływowej, Zakład Biologii Komórki, Narodowy Instytut Leków, Warszawa

S3. 09.2011 Letni kurs hodowli komórek ssaczych, Zakład Cytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

14. Członkostwo w towarzystwach naukowych

C1. Od 2014 roku jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Badań nad Miażdżycą

C2. Od 2015 roku jestem członkiem Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA)

15. Działalność organizacyjna

- Od 2016 roku jestem członkiem Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego powołanej na okres kadencji 2016-2020.
- Od 2016 roku jestem odpowiedzialna za organizację zajęć z przedmiotu Leki Pochodzenia Naturalnego w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.
- Byłam opiekunem czterech prac magisterskich.
- Jestem/byłam opiekunem i promotorem trzech prac magisterskich w roku akademickim 2017/2018 oraz 2018/2019.
- Jestem/byłam opiekunem dwóch mini-grantów studenckich w latach 2017/2018 (FW25/NM3/17) oraz 2018/2019 (FW25/NM2/18).

16. Recenzje prac naukowych

Występowałam w roli recenzenta:

- Od sierpnia 2014 roku - 65 prac naukowych złożonych do publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Time Journal of Medicinal Plant Sciences and Pharmacology* (1), *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences* (1), *Arabian Journal of Chemistry* (2), *Molecules* (19), *Foods* (1), *Scientia Pharmaceutica* (1), *Industrial Crops and Products* (11), *Molecular Nutrition and Food Research* (1), *Journal of Ethnopharmacology* (1), *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (3), *Journal of Functional Foods* (3), *Acta Pharmaceutica* (1), *Clinical Phytoscience* (2), *International Journal of Molecular Science* (5), *Phytomedicine* (1), *Journal of Medicinal Science* (1), *Current Pharmacogenomics & Personalized Medicine* (2), *Advances in Clinical and Experimental Medicine* (1), *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* (1), *Sustainability* (1), *Journal of Nutritional Medicine and Diet Care* (1), *Marine Drugs* (1), *Open Life Sciences* (1), *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (1), *Biochemical Systematics and Ecology* (1)
- Streszczeń prac zgłoszonych do prezentacji podczas konferencji dla młodych naukowców 14th Warsaw International Medical Congress for Young Scientists, 10.05-13.05.2018 r.

17. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek naukowy obejmuje:

- 20 prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR). W 10 pracach byłam pierwszym autorem.
- 5 prac przeglądowych z czego 3 zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR). W 3 pracach byłam pierwszym autorem.

- 38 streszczeń z prezentowanych doniesień na konferencjach naukowych, w tym 6 wystąpień ustnych
- udział w 6 projektach badawczych finansowanych przez NCN/WUM
- sumarczyczny współczynnik *Impact Factor* według listy JCR zgodnie z rokiem opublikowania 65,996, łączna punktacja MNiSW: 761
- łączna liczba cytowań publikacji według bazy *Web of Science Core™ Collection*: 234 (254 według bazy *Scopus*)
- łączna liczba cytowań (bez autocytowań) publikacji według bazy *Web of Science Core™ Collection*: 212 (218 według bazy *Scopus*)
- indeks Hirsha (*h-index*) według *Web of Science Core™ Collection*: 9 (10 według bazy *Scopus*)