

Warszawa, 01.03.2022

**Badania chromatograficzne (UHPLC-DAD-MS<sup>n</sup>), izolacja oraz badanie metabolizmu przez mikrobiotę jelitową składników wyciągów przygotowanych z wybranych surowców roślinnych stosowanych tradycyjnie w schorzeniach dróg moczowych**

Dominik Popowski

Laboratorium Środowiskowe Microbiota Lab; Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii

Wydział Farmaceutyczny; Warszawski Uniwersytet Medyczny

Zakażenia układu moczowego (z ang. UTIs) są jednymi z najczęściej występujących zakażeń bakteryjnych u ludzi, z szacowanym rocznym kosztem leczenia 7.5 miliarda dolarów amerykańskich rocznie w skali świata. Problem antybiotykooporności, określany przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) jako jeden z najbardziej zagrażający zdrowiu przyszłych pokoleń dotyczy również uropatogenów, a u pacjentów leczonych na UTI coraz częściej wykrywa się obecność szczepów wieloopornych. Ponadto, skuteczność antybiotykoterapii UTI jest poddawana w wątpliwość w związku z częstym występowaniem infekcji nawracających. Rośnie zatem potrzeba wprowadzenia skutecznych strategii wspomagania antybiotykoterapii i prewencji zakażeń.

Wprowadzenie antybiotyków i leków syntetycznych znacząco zmniejszyło rolę substancji roślinnych stosowanych w schorzeniach układu moczowego. Niemniej jednak, od tego czasu pojawiło się wiele doniesień próbujących ugruntować zasadność stosowania fitoterapii. Potwierdzono wiele korzystnych w leczeniu UTI aktywności biologicznych składników ekstraktów roślinnych, zarówno w badaniach *in vitro* (działanie przeciwdrobnoustrojowe, antyadhezyjne i inhibicji sygnalizacji zagęszczenia z ang. *quorum quenching*) oraz *in vivo* (działanie diuretyczne). Jednakże, większość stosowanych tradycyjnie w leczeniu schorzeń układu moczowego preparatów ziołowych stosowana nie jest opisanych w dostatecznym stopniu pod względem składu, biodostępności i metabolizmu. Ogranicza to możliwość przeprowadzenia dalszych badań, które mogłyby być podstawą do selekcji i ponownego wprowadzenia substancji roślinnych do prewencji i terapii. Ze względu na to, że większość z tych preparatów jest podawana doustnie w postaci naparów lub suchych ekstraktów, do prawidłowego określenia, jakie substancje odpowiedzialne są za efekt terapeutyczny, niezbędne jest zbadanie wpływu mikrobioty jelitowej na strukturę badanych związków.

Do analizy składników ekstraktów oraz oceny metabolizmu i przenikalności wykorzystano ultrawysokosprawną chromatografię cieczową z detektorem spektrofotometrycznym typu matrycy diodowej, sprzężoną ze spektrometrem mas z jonizacją przez elektro-rozpraszanie i analizatorem w formie pułapki jonowej (UHPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>) oraz spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Otrzymano i zliofilizowano napary wodne z ponad dwudziestu substancji roślinnych stosowanych tradycyjnie w schorzeniach układu moczowego. W badaniach metabolizmu wykorzystano mikrobiotę jelitową *ex vivo* dostarczoną przez zdrowych dawców. Inkubacja ekstraktów z mikrobiotą została przeprowadzona w warunkach beztlenowych, próbki pobierane były w kilku punktach czasowych. Scharakteryzowano również proces przenikania składników ekstraktów i metabolitów przez nabłonek jelita, wykorzystując monowarstwę komórek Caco-2 (gruczołakoraka nabłonka jelita grubego) hodowane na porowatej membranie.

Z dużą dokładnością opisano skład chemiczny kilku badanych ekstraktów. Opracowano metodą wykorzystującą biotransformację do zmniejszenia stopnia skomplikowania mieszaniny, co ułatwiło izolację i identyfikację galoilowanych pochodnych flawonoidów obecnych w kwiecie wiązówki (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.). Udowodniono, że metabolity przechodzą przez warstwę nabłonka w większym stopniu niż składniki surowego ekstraktu z ziela nawłoci (*Solidago virgaurea* L.). Na podstawie badań transportu przez monowarstwę Caco-2 potwierdzono wstępnie biodostępność składników ekstraktu wodno-etanolowego z owocni fasoli (*Phaseolus vulgaris*), posiadającego działanie antyadhezyjne.

Rezultaty badań potwierdzają możliwości uzyskania znacznie lepszej rozdzielczości i dokładności w opisie fitochemicznym przy zastosowaniu nowoczesnych technik analitycznych. Znaczna część składników badanych ekstraktów podlega biotransformacji do mniejszych, lepiej wchłanianych i aktywnych biologicznie cząsteczek pod wpływem działania mikrobioty jelitowej. Metabolitami obserwowanymi najczęściej były aglikony flawonoidów oraz pochodne kwasów hydroksyfenylopropionowego i uwodornionego kawoilochinowego. Możliwe, że są to związki biodostępne i odpowiedzialne za działanie terapeutyczne. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że w ocenie aktywności biologicznej *in vitro* substancji roślinnych, rola ich metabolitów powstałych w jelicie nie powinna być pomijana.