

ZAŁĄCZNIK 2

do wniosku o przeprowadzenie postępowania w sprawie
nadania stopnia doktora habilitowanego

AUTOREFERAT

dr inż. Tomasz Tronina

Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław 2023

Spis treści:

| | |
|--|----|
| 1. Dane osobowe: | 3 |
| 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne: | 3 |
| 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych..... | 3 |
| 4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) | 4 |
| 5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej. | 31 |
| 6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę | 42 |
| 7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej..... | 46 |

1. Dane osobowe:

Imię i nazwisko : Tomasz Tronina

Miejsce zatrudnienia: Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław

Dane kontaktowe: Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy
ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław
e-mail: tomasz.tronina@upwr.edu.pl
ORCID ID:0000-0002-8317-8976

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne:

15.05.2012: Doktor nauk biologicznych w zakresie biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Nauk o Żywności, rozprawa doktorska pt. „Mikrobiologiczne transformacje związków biologicznie czynnych, pochodzących z chmielu oraz ich pochodnych” pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Ewy Huszczy

03.07.2007: Magister biotechnologii, specjalizacja biotransformacje. Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Nauk o Żywności

06.02.2006: Inżynier w zakresie biotechnologii żywności, Akademia Rolnicza we Wrocławiu (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu), Wydział Nauk o Żywności

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

02.04.2013 – obecnie: Adiunkt w Katedrze Chemii (obecnie Chemii Żywności i Biokatalizy) Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

04.03.2013 – 30.06.2015: Pracownik naukowo badawczy (post-doc) – Centrum Algatech, Instytut Mikrobiologii Czeskiej Akademii Nauk, Trzeboń, Republika Czeska

01.06.2012: Asystent z stopniem doktora w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

01.01.2010: Asystent w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

Tytuł osiągnięcia naukowego będącego cyklem powiązanych tematycznie artykułów naukowych:

Biotransformacje i aktywność biologiczna flawonoidów z chmielu zwyczajnego oraz tarczycy bajkalskiej

Wykaz publikacji wchodzący w skład cyklu osiągnięcia naukowego:

| L.p. | Publikacja | IF ^{a,b} | Punkty MEiN ^{c,d} |
|--------------|---|--|--------------------------------------|
| P1 | Tronina, T*, Strugała, P., Popłoński, J., Włoch, A., Sordon, S., Bartmańska, A., Huszcza, E. (2017). The influence of glycosylation of natural and synthetic prenylated flavonoids on binding to human serum albumin and inhibition of cyclooxygenases COX-1 and COX-2. <i>Molecules</i> , 22(7), 1230. DOI: 10.3390/molecules22071230 | ^a 3,098 ^b 4,9 | ^c 30 ^d 140 |
| P2 | Tronina, T*, Popłoński, J., Bartmańska, A. (2020). Flavonoids as phytoestrogenic components of hops and beer. <i>Molecules</i> , 25(18), 4201. DOI: 10.3390/molecules25184201 | ^a 4,412 ^b 4,9 | ^c 100 ^d 140 |
| P3 | Tronina, T*, Mrozowska, M., Bartmańska, A., Popłoński, J., Sordon, S., Huszcza, E. (2021). Simple and rapid method for wogonin preparation and its biotransformation. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 22(16), 8973. DOI: 10.3390/ijms22168973 | ^a 6,208 ^b 6,2 | ^c 140 ^d 140 |
| P4 | Tronina, T., Bartmańska, A*, Popłoński, J., Rychlicka, M., Sordon, S., Filip-Psurska, B., Milczarek, M., Wietrzyk, J., Huszcza, E. (2023). Prenylated Flavonoids with Selective Toxicity against Human Cancers. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 24(8), 7408. DOI: 10.3390/ijms24087408 | ^a 5,600 ^b 6,2 | ^c 140 ^d 140 |
| P5 | Tronina, T*, Łużny, M., Dymarska, M., Urbaniak, M., Kozłowska, E., Piegza, M., Stępień, Ł., Janeczko, T* (2023). Glycosylation of Quercetin by Selected Entomopathogenic Filamentous Fungi and Prediction of Its Products' Bioactivity. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 2023, 24, 11857. https://doi.org/10.3390/ijms241411857 | ^a 5,600 ^b 6,2 | ^c 140 ^d 140 |
| Razem | | ^a 24,918 ^b 28,4 | ^c 550 ^d 700 |

^a Impact Factor dla roku opublikowania artykułu, ^b Impact Factor 5-letni czasopisma, ^c Punktacja MEiN dla roku opublikowania artykułu, ^d Punktacja MEiN w roku 2023, * Autor korespondencyjny

Oświadczenia habilitanta dotyczące wykonywanych prac wchodzących w skład osiągnięcia znajdują się w załączniku 3.

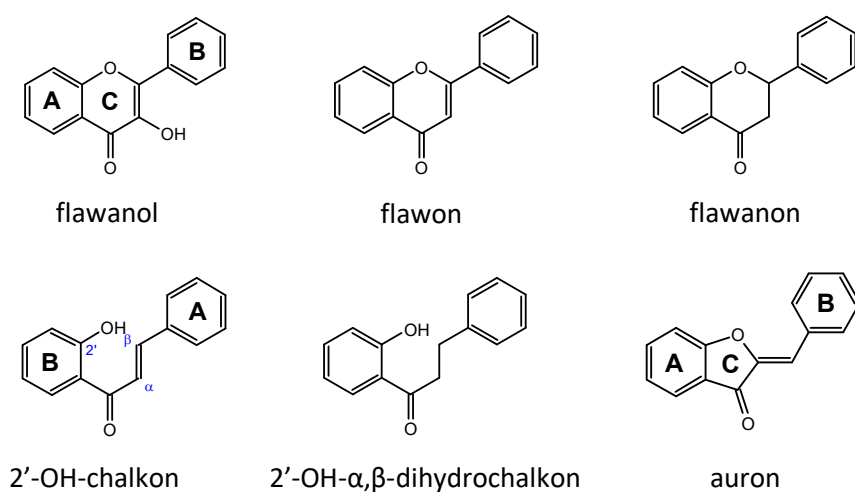
Oświadczenia współautorów prac wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku 5.

Omówienie celu naukowego osiągnięcia

Flawonoidy to naturalne metabolity wtórne roślin, które występują niemalże w każdej ich części, gdzie pełnią bardzo ważne funkcje biologiczne. Odpowiedzialne są m.in. za regulację wzrostu komórek, mają istotny wpływ na transfer energii, podobnie jak hormony i koenzymy regulują wiele szlaków komórkowych, chronią przed stresem biotycznym i abiotycznym, nadmiernym promieniowaniem UV, a także infekcjami bakteryjnymi i grzybicznymi, neutralizują reaktywne formy tlenu (ROS), zwiększają tolerancję na suszę, ciepło i mróz, nadają barwę, przyciągają owady zapylające, odpowiedzialne są również za właściwości smakowe owoców¹⁻⁵. Oprócz ważnych funkcji fizjologicznych pełniących w wytwarzających je roślinach, flawonoidy odgrywają niezwykle istotną rolę w jako składniki diety ludzi i zwierząt, wpływając terapeutycznie zwłaszcza na serce oraz układ krążenia. Działają one m.in. przeciwutleniająco, przeciwzapalnie i przeciwnowotworowo, co przyczynia się do ogólnej poprawy zdrowia i zapobiegania rozwojowi wielu chorób⁶⁻⁷. Dlatego związki te są przedmiotem licznych badań i cieszą się nieustannie zainteresowaniem przemysłu spożywczego farmaceutycznego oraz kosmetycznego.

Pod względem chemicznym, naturalne flawonoidy to polifenole, oparte na piętnastowęglowym szkielecie (układ C₆-C₃-C₆), w których dwa pierścienie aromatyczne A i B połączone są ze sobą trójwęglowym łącznikiem, tworząc najczęściej dodatkowy pierścień heterocykliczny C o różnym stopniu podstawienia atomów węgla. Ze względu na modyfikację struktury podstawowej w tym: obecność bądź brak pierścienia heterocyklicznego C, jego stopień utlenienia, miejsce przyłączenia pierścienia aromatycznego do trójwęglowego łącznika (pozycja C2 lub C3) flawonoidy podzielono na 28 klas⁸ w tym m.in.: flawany, flawony, flawanony, flawanole, dihydroflawanole, flawan-3-ole, izoflawony, izoflawanony, antocyjanidyny, chalkony, α,β-dihydrochalkony, auron i auronole.

W badaniach, których efekty składają się na osiągnięcie naukowe, skupiono się na flawonoidach należących do flawonoli, flawonów, flawanonów, chalkonów, α,β-dihydrochalkonów i auronów, których podstawowe struktury przedstawiono poniżej (Rys. 1).



Rysunek 1. Szkielety flawonoidów opisanych w publikacjach wchodzących w skład cyklu osiągnięcia naukowego.

Aktywność biologiczna, biodostępność oraz metabolizm flawonoidów zależy w głównej mierze od budowy szkieletu, liczby i pozycji grup hydroksylowych, obecności innych podstawników, takich jak grupy metoksyłowe, prenyłowe czy geranyłowe oraz od sprzęgania z polarnymi cząsteczkami takimi jak cukry, a także od stopnia polimeryzacji flawonoidów⁹⁻¹⁰. Dzięki swojej zróżnicowanej budowie, flawonoidy mogą wykazywać bardzo wszechstronne i pożądane dla człowieka właściwości biologiczne, przez co uważane są za związki o dużym potencjale terapeutycznym. Ze względu na obecność licznych niepodstawionych grup hydroksylowych, wykazują wysoką aktywność przeciwutleniającą, zmiatając wolne rodniki oraz chelatując kationy metali znacząco zapobiegają tworzeniu i akumulacji reaktywnych form tlenu (ROS), które poprzez reakcje utleniania niszczą biomolekuły i struktury komórkowe¹⁰. Liczne badania dowodzą, że oprócz przypisywanej flawonoidom wysokiej aktywności przeciwutleniającej, związki te wykazują szereg pożądanych właściwości biologicznych takich jak: przeciwzapalne, immunomodulujące, kardioprotekcyjne, hepatoprotekcyjne, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, przeciw pasożytnicze, przeciwgrzybicze, przeciwstarzeniowe oraz przeciwnowotworowe^{1, 5-6, 9-11}. Skuteczność terapeutyczna flawonoidów jest jednak limitowana ich niską biodostępnością, co związane jest m.in. z ograniczoną rozpuszczalnością w wodzie. Słaba rozpuszczalność aglikonów w połączeniu z krótkim czasem przebywania w jelitach, wpływa na ich ograniczone wchłanianie, co często stanowi problem dla ich zastosowań leczniczych¹⁰. Pomimo wysokiego potencjału terapeutycznego, niska przyswajalność oraz niska zawartość w materiale roślinnym, stanowią ogromne wyzwanie dla skutecznego wykorzystywania tych związków jako potencjalnych leków. Dlatego bezustannie poszukuje się tanich i efektywnych metod pozyskiwania tych polifenoli poprzez ekstrakcję z roślin, wykorzystując klasyczną syntezę chemiczną oraz metody biotechnologiczne z zastosowaniem mikroorganizmów i enzymów oraz metody inżynierii genetycznej, metabolicznej oraz biologii syntetycznej umożliwiającej biosyntezę flawonoidów bezpośrednio w komórkach rekombinowanych organizmów¹²⁻¹⁴.

Izolowanie czystych flawonoidów z matrycy roślinnych jest procesem żmudnym i czasochłonnym. Z uwagi na to, że zawartość pożądanego flawonoidu jest najczęściej niewielka, a sam proces izolowania jest mało selektywny, zwykle otrzymuje się mieszaninę podobnych strukturalnie pochodnych, co zdecydowanie utrudnia proces późniejszego oczyszczania¹². Totalna synteza chemiczna obejmuje wiele etapów, na których konieczne jest oczyszczanie otrzymanych półproduktów, by móc je później użyć w kolejnej reakcji¹⁵. Wpływa to na niską wydajność końcowej syntezy oraz generuje duże ilości odpadów w postaci zużytych rozpuszczalników organicznych i nierzadko toksycznych katalizatorów chemicznych. Bezpieczną alternatywą są metody biotechnologiczne. Skutecznymi metodami otrzymywania naturalnych flawonoidów są biotransformacje prowadzone z wykorzystaniem kultur całych komórek mikroorganizmów lub izolowanych, często immobilizowanych, enzymów pochodzących z mikroorganizmów, roślin czy zwierząt¹⁴. Procesy te mają zdecydowanie mniejszy negatywny wpływ na środowisko w porównaniu z metodami klasycznej syntezy chemicznej, ponieważ są prowadzone w łagodnych warunkach (przy ciśnieniu atmosferycznym, w niskiej, optymalnej dla działania biokatalizatora, temperaturze), co znacząco obniża całkowite zużycie energii podczas prowadzenia procesu. Biokatalizatory, w odróżnieniu od katalizatorów chemicznych, są całkowicie biodegradowalne. Oprócz specyficzności substratowej, ogromną zaletą wykorzystania enzymów w

syntezie jest wysoka selektywność działania, wynikająca z chemo-, regio-, stereo- (enancjo-, diastereo-) selektywności enzymów. Zmniejsza to nie tylko ilość niepożądanych produktów ubocznych, ale umożliwia otrzymanie związków, które często są trudne do uzyskania metodami klasycznej syntezy chemicznej¹⁶.

Głównym celem badań, których efekty wchodzą w skład osiągnięcia naukowego, było wydzielenie i oczyszczenie flawonoidów pochodzących z chmielu zwyczajnego i tarczycy bajkalskiej, ich biotransformacje w kulturach grzybów strzępkowych oraz określenie aktywności biologicznej otrzymanych metabolitów.

Główny cel zrealizowano poprzez następujące cele szczegółowe:

- Wyzdalenie i oczyszczenie flawonoidów z materiału roślinnego;
- Synteza chemiczna flawonoidów;
- Otrzymanie flawonoidów na drodze biotransformacji;
- Określenie aktywności biologicznej otrzymanych flawonoidów (m.in. przeciwnowotworowej, przeciwzapalnej, zdolności wiązania do ludzkiej albuminy surowicy krwi, oraz *in silico*) wraz z określeniem wpływu czynników strukturalnych flawonoidów.

Otrzymanie i określenie aktywności biologicznej flawonoidów chmielu oraz ich naturalnych i chemicznych pochodnych

Badania objęte powyższym tematem zostały opisane w czterech publikacjach składających się na osiągnięcie naukowe:

P1. Tronina, T*, Strugała, P., Popłoński, J., Włoch, A., Sordon, S., Bartmańska, A., Huszcza, E. (2017). The influence of glycosylation of natural and synthetic prenylated flavonoids on binding to human serum albumin and inhibition of cyclooxygenases COX-1 and COX-2. *Molecules*, 22(7), 1230. DOI: 10.3390/molecules22071230

P2. Tronina, T*, Popłoński, J., Bartmańska, A. (2020). Flavonoids as phytoestrogenic components of hops and beer. *Molecules*, 25(18), 4201. DOI: 10.3390/molecules25184201

P3. Tronina, T*, Mrozowska, M., Bartmańska, A., Popłoński, J., Sordon, S., Huszcza, E. (2021). Simple and rapid method for wogonin preparation and its biotransformation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8973. DOI: 10.3390/ijms22168973

P4. Tronina, T., Bartmańska, A*, Popłoński, J., Rychlicka, M., Sordon, S., Filip-Psurska, B., Milczarek, M., Wietrzyk, J., Huszcza, E. (2023). Prenylated Flavonoids with Selective Toxicity against Human Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7408. DOI: 10.3390/ijms24087408

Chmiel zwyczajny (*Humulus lupulus* L.) znany jest jako jeden z głównych surowców piwowarskich. Roczna produkcja chmielu na świecie wynosi około 130 tysięcy ton¹⁷, z czego aż 97% przeznaczone jest do produkcji piwa¹⁸. Kwiatostany żeńskie chmielu - szyszki chmielowe są bogate w humulony (α -kwasy) i lupulony (β -kwasy), które nadają piwu charakterystyczny aromat i gorzki smak, a także chronią je przed rozwojem bakterii i pleśni. Gruczoły lupulinowe oprócz tzw. gorzkich kwasów wydzielają również prenylowane flawonoidy, które wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej. Głównym prenylowanym flawonoidem chmielu jest chalkon zwany ksantohumolem (1),

którego zawartość w suchych szyszkach waha się od 0,1 do 1% i zależy w dużej mierze od odmiany chmielu oraz warunków jego wegetacji. Oprócz ksantohumolu (**1**) żywica lupulinowa zawiera również inne prenylowane flawonoidy, jednak ich zawartość jest od 10- do 100-krotnie niższa w stosunku do ksantohumolu (**1**)¹⁹. W ostatnich latach ksantohumol (**1**) stał się przedmiotem licznych badań z uwagi na swoją różnorodną i silną aktywność biologiczną. Udowodniono bowiem, że związek ten wykazuje m.in. właściwości przeciwzapalne, przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, zapobiega rozwojowi zarodźców malarii oraz przeciwdziała otyłości¹⁹⁻²². Jednak najważniejsze odkrycie ostatnich 20 lat to wykazanie jego działania przeciwnowotworowego. Ksantohumol (**1**) znacząco hamuje rozwój wielu różnych ludzkich komórek nowotworowych *in vitro*²³⁻²⁷, zarówno podczas inicjacji, promocji, jak i progresji kancerogenezy, w związku z czym uznaje się go za związek przeciwnowotworowy o szerokim spektrum działania¹⁹. Niezwykle silną i różnorodną aktywność biologiczną ksantohumolu (**1**) przypisuje się obecności grupy prenylowej w jego strukturze. Wiadomo, że prenylacja flawonoidów zwiększa ich aktywność przeciwbakteryjną, przeciwzapalną, przeciwutleniającą, cytotoksyczną, insektobójczą i estrogenną flawonoidów²⁸. Prenylowy łańcuch boczny może bowiem zwiększać powinowactwo wiązania flawonoidów do glikoproteiny P, co skutkuje znaczną poprawą aktywności biologicznej²⁹, w tym właściwości przeciwnowotworowych³⁰. Ponadto, w wielu przypadkach prenylowane flawonoidy działają selektywnie, wykazując wyższy efekt cytotoksyczny wobec komórek nowotworowych niż w stosunku do komórek prawidłowych³⁰. Obecność niepolarniej grupy prenylowej w cząsteczce flawonoidów przynosi jednocześnie niekorzystne efekty w postaci obniżenia ich rozpuszczalności w wodzie, co z kolei wpływa negatywnie na ich biodostępność i zmniejsza wchłanianie²⁸, a w konsekwencji limituje potencjał terapeutyczny tych cennych biologicznie aktywnych związków.

Badania realizowane w ramach projektu badawczego SONATA 9 (Zał. 3., II, 9.5.), opublikowane w pracy **P1**, dotyczyły wpływu budowy szkieletu prenylowanych flawonoidów (chalkonu, α,β -dihydrochalkonu oraz auronu) oraz obecności grupy cukrowej w cząsteczce na aktywność biologiczną, w tym przeciwzapalną, wyrażoną jako zdolność do hamowania aktywności cyklooksygenazy 1 i 2 (COX-1, COX-2) oraz siły wiązania do ludzkiej albuminy surowicy krwi, co umożliwiła określenie możliwości transportu substancji aktywnej w organizmie.

Podczas realizacji badań dopracowano wykorzystywaną wcześniej metodę otrzymywania ksantohumolu (**1**) z wychmielin dodając dodatkowy etap oczyszczania. Opracowana wcześniej metoda³¹ izolowania ksantohumolu z wychmielin (odpadu przemysłowego powstającego przy ekstrakcji kwasów gorzkich z szyszek chmielowych za pomocą dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym) polegała na:

- 1) ekstrakcji wychmielin rozpuszczalnikiem organicznym
- 2) rozdziale chromatograficznym ekstraktu z wykorzystaniem złoża Sephadex® LH-20 oraz metanolu jako eluentu
- 3) rozdziale chromatograficznym frakcji zawierających ksantohumol (**1**) z wykorzystaniem żelu krzemionkowego (silica 60) jako złoża i mieszaniny metanol:chloroform jako eluentu³¹

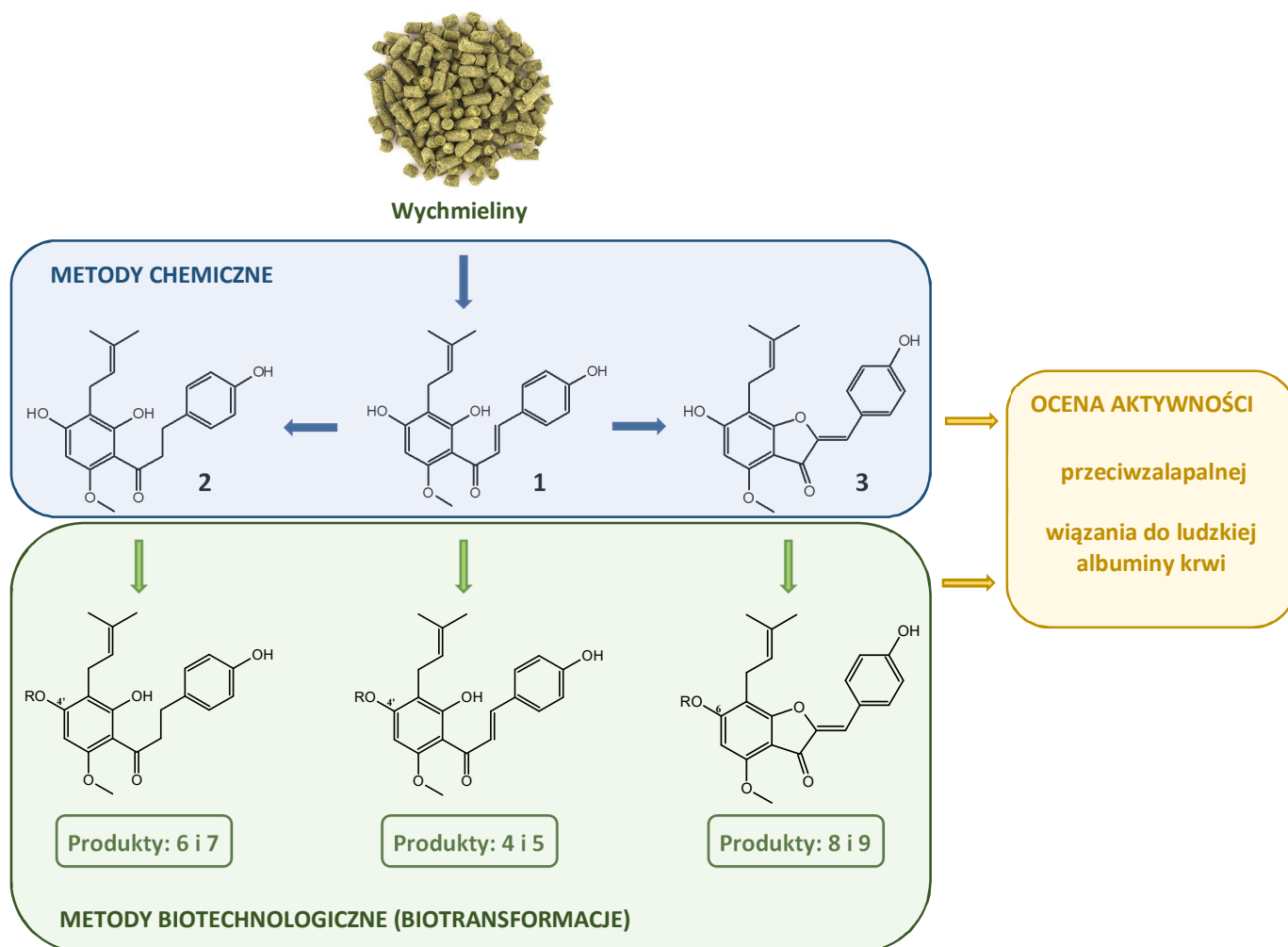
Otrzymany w ten sposób ksantohumol (**1**) posiadał czystość około 93-94% i zawierał śladowe ilości innych trudnych do oddzielenia prenylowanych flawonoidów.

Dopracowanie metody polegało na dodaniu etapu doczyszczania:

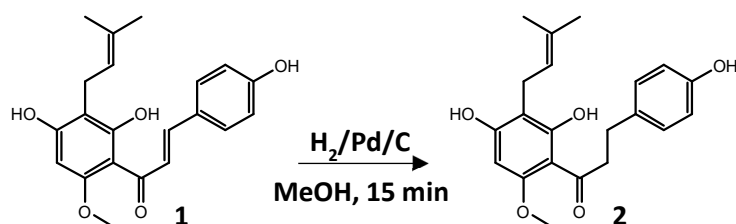
- 4) rozdział chromatograficzny frakcji zawierających ksantohumol (**1**) z wykorzystaniem żelu krzemionkowego (silica 60) jako złoża oraz mieszaniny chlorek metylenu:eter dietylowy:heksan:kwas mrówkowy w stosunku objętościowym (200:40:28:1) jako eluentu

Otrzymany w ten sposób ksantohumol (**1**) posiadał czystość powyżej 98%, a ponadto na tym etapie izolowano również inne, niedostępne komercyjnie, aktywne biologicznie prenylowane chalkony chmielu, m.in. ksantohumol C oraz ksantohumol D.

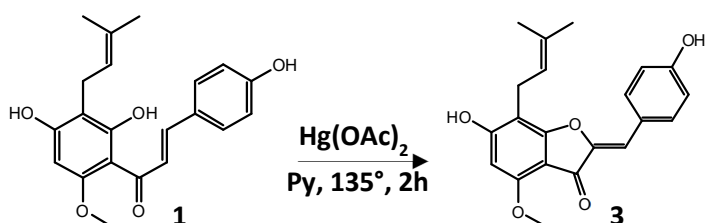
Czysty wyizolowany z wychmielin ksantohumol (**1**) posłużył jako materiał wyjściowy do otrzymania innych prenylowanych flawonoidów o budowie α,β -dihydrochalkonu oraz auronu. Na drodze przekształceń chemicznych zsyntezowano α,β -dihydroksantohumol (**2**) i (Z)-6,4'-dihydroksy-4-metoksy-7-prenyloauron (**3**), które wykorzystano następnie jako substraty do biotransformacji. Schemat tych i dalszych badań przedstawiono na schemacie poniżej.



Schemat 1. Otrzymywanie ksantohumolu **1** i jego pochodnych **2-9**

Synteza α,β -dihydroksantohumolu (2)**Rysunek 2.** Synteza α,β -dihydroksantohumolu (2) z ksantohumolu (1)

α,β -Dihydroksantohumol (2) występuje naturalnie w chmielu, przy czym jego zawartość jest na tyle mała, że izolowanie go jest nieefektywne. Mimo to przeprowadzone przez nas badania udowodniły jego silną aktywność przeciwnowotworową *in vitro*³²⁻³³ (Zał. 3, II, 4.5. oraz Zał. 3, II, 4.19), dlatego związek ten jest atrakcyjnym przedmiotem badań. Dihydrochalkon 2 można otrzymać poprzez regioselektywne uwodornienie wiązania α,β -olefinowego w ksantohumolu (1) zarówno metodami biotechnologicznymi, poprzez biotransformacje ksantohumolu (1) w kulturach grzybów strzępkowych *Fusarium tricinctum* AM16³² (Zał. 3, II, 4.5.) – metoda ta została opatentowana (Zał. 3., III, 3.1.48.) oraz drożdży *Rodotorula marina* AM77³⁴, jak również chemicznymi z wykorzystaniem palladu na węglu aktywnym jako katalizatora oraz gazowego H_2 jako donora atomów wodoru³⁵ (Zał. 3, II, 4.11.), Metoda chemiczna jak dotąd jest najbardziej wydajnym sposobem otrzymania α,β -dihydroksantohumolu (2).

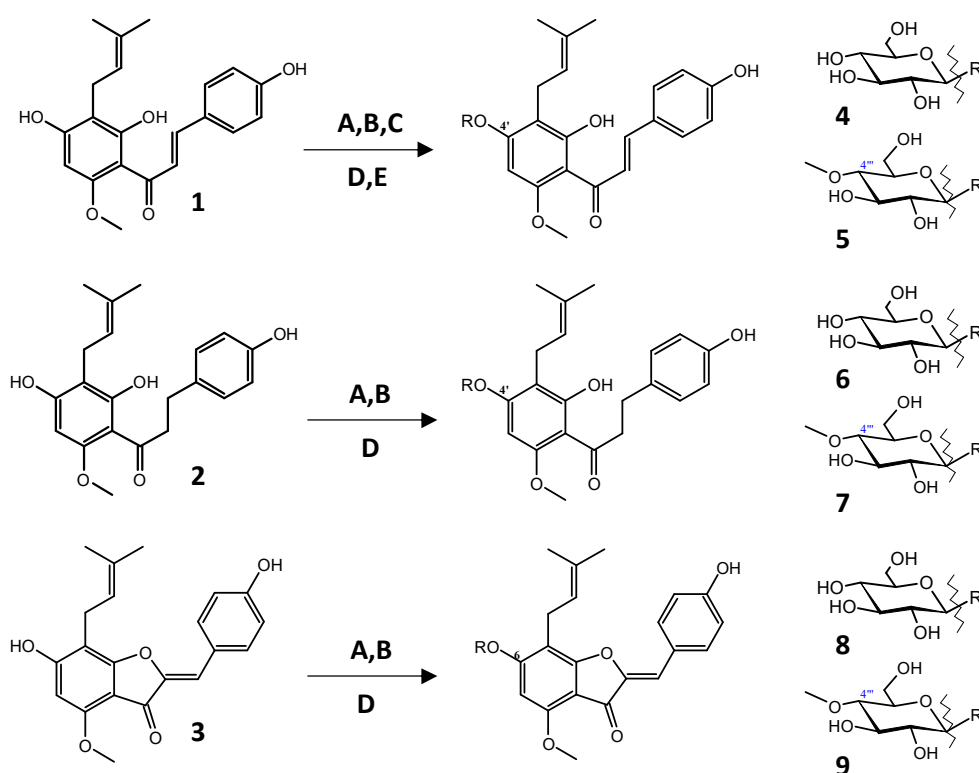
Synteza (Z)-6,4'-dihydroksy-4-metoksy-7-prenyloauronu (3)**Rysunek 3.** Synteza (Z)-6,4'-dihydroksy-4-metoksy-7-prenyloauronu (3) z ksantohumolu (1)

Aurony stanowią jedną z najmniej rozpowszechnionych w naturze klas flawonoidów i często określane są jako tzw. „flawonoidy o mniejszym znaczeniu” (ang. minor flavonoids). Związki te, mimo że występują tylko w niewielkich ilościach, posiadają udowodnioną aktywność biologiczną, w tym antynowotworową³⁶. W publikacji P1 zaproponowano, nową, nieznaną metodę wydajnej syntezy prenylowanego auronu (Z)-6,4'-dihydroksy-4-metoksy-7-prenyloauronu (3) z ksantohumolu (1), polegającą na reakcji cyklizacji typu chalkon-auron, z wykorzystaniem octanu rtęci w pirydynie jako katalizatora. Sposób otrzymywania tego związku został opatentowany (Zał. 3., III, 3.1.50.). Otrzymany opisaną metodą związek 3 poddano badaniu na aktywność przeciwnowotworową, co opisano w publikacji P4.

Wyizolowany z wychmielin chalkon - ksantohumol (**1**) oraz jego pochodne o strukturze dihydrochalkonu (**2**) oraz auronu (**3**), wykorzystano jako substraty do biotransformacji z wykorzystaniem kultur grzybów strzępkowych. Jako katalizatory wybrano grzyby znane ze swoich zdolności do katalizowania regioselektywnej reakcji przyłączania reszt cukrowych do cząsteczek flawonoidów. Wybór tych właśnie mikroorganizmów/przekształceń nie był przypadkowy. Obecność niepolarniej grupy prenylowej we flawonoidach, pomimo, iż wpływa na zwiększenie aktywności biologicznej flawonoidów, zmniejsza ich biodostępność i wchłanianie z przewodu pokarmowego, co związane jest głównie z obniżeniem ich rozpuszczalności w wodzie²⁸. Obecność grupy cukrowej w cząsteczce flawonoidów znacząco zwiększa rozpuszczalność w roztworach wodnych. Przykładowo, rozpuszczalność naringiny, będącej glikozydem naringeniny jest 110-krotnie wyższa niż naringeniny³⁷⁻³⁸, z kolei glikozyd kwercetyny – rutyna jest ponad 240-krotnie lepiej rozpuszczalny w wodzie niż jej aglikon³⁹. Obecność reszty glukozy w cząsteczce niektórych flawonoidów znacząco wpływa na zwiększenie ich biodostępności. Przykładem może być występująca m.in. w chmielu, kwercetyna. W badaniach *in vivo* przeprowadzonych na psach wykazano, że przyswajalność 3-*O*-glukozydu kwercetyny (izokwercetyny), jest 235% wyższa w porównaniu do kwercetyny⁴⁰. Badania biologiczne kwercetyny oraz jej glikozydów otrzymanych na drodze regioselektywnej glikozylacji z wykorzystaniem grzybów entomopatogennych są przedmiotem badań opisanych we włączonej do cyklu publikacji **P5**.

Badania farmakokinetyczne ksantohumolu (**1**) pokazują, że związek ten jest bardzo słabo przyswajany z układu pokarmowego. Biodostępność głównego prenylowanego flawonoidu chmielu **1**, po podaniu szczurom w dawkach 40, 100, 200 mg/kg masy ciała wyniosła odpowiednio 1,16%, 0,96% oraz 0,53%⁴¹, co może być wynikiem znacznie ograniczonego wchłaniania w jelicie cienkim i szybkiego metabolizmu ksantohumolu (**1**) przez mikroorganizmy w okrężnicy¹⁹. Tak niska biodostępność po podaniu doustnym, może znacząco limitować wysoki potencjał terapeutyczny ksantohumolu (**1**), dlatego badanie glikozylowanych pochodnych prenylowanych flawonoidów, które polepszają rozpuszczalność w wodzie i potencjalnie mogą zwiększać ich biodostępność i wchłanianie jest tak ważne. Chemiczne wprowadzanie reszt cukrowych do flawonoidów jest niezwykle trudne i bardzo często wiąże się z wprowadzaniem fragmentu cukrowego jeszcze przed wytworzeniem szkieletu flawonoidowego. Końcowym etapem jest odblokowanie grup hydroksylowych, poprzez usunięcie grup ochronnych w cząsteczce cukrowca, co może prowadzić do degradacji syntezowanego glikozydu. Z uwagi na różną reaktywność grup hydroksylowych, związanych z ich konkretnym położeniem w cząsteczce, obecnością zawad sterycznych, możliwością tworzenia wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, nie ma jednej strategii wprowadzania reszt cukrowych do flawonoidów metodami chemicznymi¹⁵. Z kolei u żywych organizmów, za sprawą enzymów z grupy glikozylotransferaz (GTs), glikozylacja jest procesem naturalnym i dominującą strategią wykorzystywaną do regulowania właściwości fizykochemicznych i biologicznych zarówno makro-, jak i mikrocząsteczek⁴²⁻⁴⁴. Naturalne wydaje się więc stosowanie metod biotechnologicznych, w tym przede wszystkim procesu biotransformacji całymi komórkami dzikich szczepów mikroorganizmów wykazujących zdolność do katalizowania regioselektywnych reakcji glikozylacji, do otrzymywania glikozylowanych pochodnych bioaktywnych związków, w tym flawonoidów. W publikacji **P1** opisano proces biotransformacji prenylowanych flawonoidów: ksantohumolu (**1**), α,β -dihydrochalkonu (**2**) oraz (*Z*)-6,4'-dihydroksy-4-

metoksy-7-prenyloauronu (**3**) do ich glikozylowanych pochodnych. Jako biokatalizatory wykorzystano grzyby strzępkowe znane ze swoich zdolności do przyłączania reszt glukopiranozy lub/i 4-*O*-metyloglukopiranozy do cząsteczek flawonoidów. Wśród zastosowanych szczepów były grzyby należące do rodzaju *Absidia*: *A. coerulea* AM93 i *A. glauca* AM177, grzyby *Rhizopus nigricans* UPF701 oraz porażające owady grzyby z rodzaju *Beauveria*: *B. bassiana* AM278 oraz *B. bassiana* AM446, zdeponowane w kolekcji mikroorganizmów Katedry Chemii Żywności i Biokatalizy Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Reakcje regioselektywnej glikozylacji prenylowanych flawonoidów **1-3** przedstawiono na rysunku 4.



Rysunek 4. Regioselektywna glikozylacja prenylowanych flawonoidów **1-3** katalizowana przez (A) *Absidia coerulea* AM93, (B) *Absidia glauca* AM177, (C) *Rhizopus nigricans* UPF701, (D) *Beauveria bassiana* AM278 i (E) *Beauveria bassiana* AM446.

Wykorzystane do biotransformacji szczepy z rodzaju *Absidia* oraz *Rhizopus* katalizowały reakcję przyłączenia cząsteczki glukozy, podczas gdy, entomopatogenne grzyby z gatunku *Beauveria bassiana*, charakterystyczną dla siebie koniugację jej pochodnej – 4-*O*-metylo-glukopiranozy. Część z tych reakcji została wcześniej opisana⁴⁵⁻⁴⁶ (Zał. 3, II, 4.1., 4.6.). Wszystkie użyte grzyby prowadziły reakcję *O*-glikozylacji regioselektywnie, przyłączając cząsteczkę cukrowca w ekwiwalentnej pozycji flawonoidów –C4'-OH w przypadku chalkonu **1** i α,β -dihydrochalkonu **2**, oraz C6-OH w przypadku auronu **3** (w obrębie wymienionych klas flawonoidów stosowana jest różna numeracja atomów węgla).

Otrzymane w trakcie realizacji badań nowe związki oraz biotechnologiczne metody ich otrzymywania zostały opatentowane: glikozyd ksantohumolu (**4**) – Zał. 3., III, 3.1.60., glikozyd α,β -

dihydroksantohumolu (6) – Zał. 3., III, 3.1.38., glukozyd (Z)-6,4'-dihydroksy-4-metoksy-7-prenyloauronu (8) – Zał. 3., III, 3.1.53., 4'''-O-metyloglukozyd (Z)-6,4'-dihydroksy-4-metoksy-7-prenyloauronu (9) – Zał. 3., III, 3.1.52.

Wykorzystane jako substraty prenylowane aglikony **1-3**, oraz ich glikozydy **4-9** otrzymane na drodze biotransformacji użyte zostały następnie do badań na aktywność przeciwzapalną wyrażoną jako zdolność hamowania cyklooksygenazy 1 i 2 (COX-1, COX-2) oraz zdolność wiązania do ludzkiej albuminy surowicy krwi. Odrębnym zadaniem było określenie wpływu rodzaju szkieletu flawonoidowego (chalkony **1, 4, 5** vs α,β -dihydrochalkony **2, 6, 7** vs auron **3, 8, 9**), obecności polarnego fragmentu cukrowego (aglikony **1-3** vs glikozydy **4-9**) oraz rodzaju przyłączonego cukru (glukozydy **4, 6, 8** vs 4-O-metyloglukozydy **5, 7, 9**) na badane aktywności.

Badania aktywności przeciwzapalnej

Wcześniejsze doniesienia wykazały, że ksantohumol (**1**) jest silnym czynnikiem przeciwzapalnym⁴⁷⁻⁵⁰. Badania przedstawione w publikacji **P1** miały wyjaśnić czy zmiana szkieletu chalkonu (**1**), poprzez uwodornienie α,β -nienasyconego wiązania olefinowego do α,β -dihydrochalkonu (**2**) lub poprzez cyklizację z wytworzeniem dodatkowego pięciocłonowego pierścienia heterocyklicznego do auronu (**3**) oraz obecność dużej polarnej grupy cukrowej w bezpośrednim sąsiedztwie grupy prenylowej, wpływa na zmianę aktywności przeciwzapalnej ksantohumolu (**1**). Jako parametr aktywności przeciwzapalnej uznano zdolność do hamowania konstytutywnej cyklooksygenazy 1 (COX-1), odpowiedzialnej m.in. za produkcję w przewodzie pokarmowym prostaglandyn, które biorą udział w ochronie błony śluzowej i innych czynnościach fizjologicznych oraz indukowanej czynnikami związanymi ze stanem zapalnym cyklooksygenazy 2 (COX-2), która odpowiada za produkcję prostaglandyn zaangażowanych w przebieg procesu zapalnego, takich jak powstawanie obrzęku, gorączki i bólu.

Otrzymane wyniki wskazują że głównymi czynnikami determinującymi wysoką aktywność przeciwzapalną są zarówno rodzaj szkieletu flawonoidu jak i obecność grupy cukrowej w cząsteczce flawonoidu. Redukcja podwójnego wiązania α,β , jak również cyklizacja typu chalkon-auron nie jest pożądana. Obie pochodne ksantohumolu (**1**): α,β -dihydrochalkon **2** i auron **3** wykazywały dwukrotnie niższą zdolność hamowania aktywności obu cyklooksygenaz. Obecność dużej polarnej grupy cukrowej sprzężonej z prenylowanym flawonoidem powodowała z kolei aż 3-4-krotny spadek aktywności w porównaniu do aglikonów. Spośród przebadanych związków najniższą aktywność wykazywały pochodne zawierające w swej strukturze O-metylowaną pochodną glukozy.

Badania zdolności wiązania do albuminy ludzkiej surowicy krwi

Albumina jest jednym z głównych białek osocza wytwarzanym w wątrobie u ludzi i wielu gatunków zwierząt, jest rezerwą białkową organizmu wykorzystywaną jako endogenne źródło aminokwasów do syntezy białek poza wątrobą. Białko posiada liczne właściwości biologiczne i fizjologiczne w tym: działanie przeciwzapalnie, przeciwutleniające, przeciwzakrzepowe, zapobiegające agregacji płytek krwi⁵¹, pełni ważne funkcje utrzymując koloidalne ciśnienie osmotyczne i oraz prawidłową wartość pH

krwi, jednak fundamentalne znaczenie przypisuje się jej funkcji transportowej. Albumina jest w stanie wiązać się z prawie wszystkimi znanymi lekami, a także z wieloma nutraceutykami i substancjami toksycznymi, w dużej mierze determinując ich farmako- i toksykokinetykę⁵². Efektywność rozprowadzania substancji bioaktywnych uzależniona jest więc w dużej mierze od możliwości związania się z albuminą jako ich transporterem. W celu określenia czy pochodne ksantohumolu oraz ich glikozydy otrzymane w procesach biotransformacji mogą być efektywnie rozprowadzane po ustroju, przeprowadzono badania ich interakcji z albuminą. Określono m.in. mechanizm wiązania, jego siłę oraz rodzaje wiązań i oddziaływań jakie występują między białkiem i flawonoidem. Na podstawie otrzymanych danych określono jak zmiana szkieletu flawonoidowego oraz obecność grup cukrowych wpływa na efektywność wiązania. Wykazano, iż wszystkie testowane flawonoidy wiążą się do albuminy głównie za pomocą wiązań wodorowych oraz oddziaływań van der Waalsa, sam proces jest spontaniczny, a wiązanie odbywa się w układzie jedna cząsteczka flawonoidu - jedna molekula białka. Zarówno redukcja wiązania α,β -olefinowego (związek **2**), jak również cyklizacja chalkonu (**1**) do auronu (**3**) znacząco zmniejsza powinowactwo wiązania. Sugeruje to, że rodzaj szkieletu prenylowanych aglikonów ma ogromne znaczenie w wiązaniu się z białkami ludzkiego osocza, a sam parametr siły wiązania przedstawiają się następująco: chalkon **1** > α,β -dihydrochalkon **2** > auron **3**. Podobnie na powinowactwo wiązania do albuminy wpływa glikozylacja, obecność dużej polarnej grupy w bezpośrednim sąsiedztwie grupy prenylowej znacząco je obniża. Prawdopodobnie związane jest to z rozmiarem grupy cukrowej, która stanowić może zawadę steryczną i ogranicza dostęp do kieszeni wiążącej. Ponadto obecność cukrowca w strukturze, znacząco zwiększa polarność w całej cząsteczki, co wpływa na zmniejszenie zdolności glikozydów flawonoidowych do penetracji bogatych w tryptofan hydrofobowych obszarów wewnętrznych albuminy, gdzie wiąże się ksantohumol (**1**).

Badania cytotoksyczności

Otrzymany w wyniku opatentowanej metody syntezy (Z)-6,4'-dihydroksy-4-metoksy-7-prenyloauronu (**3**) oraz ksantohumol (**1**) są przedmiotem publikacji **P4**. Chalkon **1** i auron **3** badane były pod względem aktywności antyproliferacyjnej *in vitro* wobec dziesięciu linii ludzkich komórek nowotworowych oraz dwóch linii komórek prawidłowych, w porównaniu do pozytywnej kontroli, z zastosowaniem związku referencyjnego jakim była cisplatylna – lek cytostatyczny powszechnie stosowany w chemioterapii wielu rodzajów nowotworów złośliwych.

Powszechnie stosowane leki przeciwnowotworowe, takie jak doksorubicyna czy cisplatylna, cechuje nieselektywne działanie, są bowiem toksyczne zarówno dla komórek rakowych, jak i prawidłowych. Z tego powodu intensywnie poszukuje się nowych, potencjalnych leków o selektywnym działaniu, które aktywne byłyby głównie przeciwko komórkom nowotworowym, wykazując zarazem niską toksyczność wobec prawidłowych komórek pacjenta. Idealnymi kandydatami do badań wydają się być związki izolowane z ziół oraz roślin leczniczych wykorzystywanych w tradycyjnej medycynie ludowej, gdyż wiele z nich wykazuje silną aktywność biologiczną przy jednoczesnej niskiej toksyczności.

Celem niniejszej pracy (**P4**) było wykazanie, w jaki sposób modyfikacja struktury prenylowanego chalkonu **1** o dowiedzionej aktywności przeciwnowotworowej, do jego pochodnej o szkielecie auronu **3**, może wpływać na hamowanie wzrostu i selektywność działania wobec ludzkich linii komórek nowotworowych *in vitro* oraz porównanie aktywności obu związków do cisplatylny. W tym celu oba

prenylowane flawonoidy **1** i **3** oraz związek referencyjny testowano w kierunku właściwości antyproliferacyjnych wobec dziesięciu linii ludzkich komórek nowotworowych: raka piersi (MCF-7, SK-BR-3, T47D), raka okrężnicy (HT-29, LoVo, LoVo/Dx – linia oporna na lek dokсорubicynę), raka prostaty (PC-3, Du145), raka płuc (A549) i białaczki (MV-4-11). W celu wykazania selektywności działania badanych związków, aktywność antyproliferacyjną testowano równolegle wobec komórkom prawidłowym, w tym linii komórkowej HLMEC (prawidłowe komórki ludzkiego śródbłonna płuc) oraz często wykorzystywanej do tego typu badań linii komórkowej BALB3/T3 (prawidłowe fibroblasty mysie). Zdolność antyproliferacyjną wyrażono jako IC_{50} w μM (ang. half maximal Inhibitory Concentration), stężenie badanego związku, które hamuje wzrost badanej populacji komórek o połowę.

W przeprowadzonych badaniach zarówno ksantohumol (**1**), jak i auron **3** wykazywały od silnej (MCF-7, T47D, LoVo, LoVo/Dx, MV-4-11) do umiarkowanej (SK-BR-3, PC-3, Du145, A549) aktywności cytotoksycznej wobec badanych linii komórek nowotworowych. Wyjątek stanowiły komórki raka jelita grubego (HT-29), w przypadku których IC_{50} dla obu związków **1** i **3** wynosiło $> 50 \mu\text{M}$, co można uznać za stosunkowo wysokie stężenie, zatem niską aktywność antyproliferacyjną. Zarówno chalkon **1**, jak i auron **3** okazały się tak samo skutecznymi cytostatykami co lek cisplatyna w przypadku aż siedmiu nowotworowych linii komórkowych (MCF-7, SK-BR-3, T47D, LoVo, LoVo/Dx, PC-3 i A549, brak znaczących różnic przy $p < 0,05$). Badane flawonoidy **1** i **3** wykazywały natomiast zdecydowanie niższą aktywność antyproliferacyjną wobec komórek prawidłowych, przy czym najmniej aktywnym związkiem okazał się (Z)-6,4'-dihydroksy-4-metoksy-7-prenyloauron (**3**), który był 1,5-krotnie mniej aktywny wobec linii komórkowej HLMEC i 2,3-krotnie wobec BALB3/T3 niż ksantohumol (**1**) oraz analogicznie blisko 42-krotnie i 5-krotnie niż cisplatyna.

Zestawiając ze sobą wyniki aktywności antyproliferacyjnej badanych związków wobec komórek nowotworowych oraz komórek prawidłowych, można wyznaczyć parametr selektywności działania potencjalnego terapeutycznego – współczynnik selektywności SI (ang. Selectivity Index). Ze względu na fakt, że w badaniach opisanych w pracy **P4** wykorzystano dwie różne prawidłowe linie komórkowe (mysie i ludzkie), dla każdej z nich oddzielnie wyznaczono współczynnik selektywności SI, dzieląc wartość IC_{50} wyznaczoną dla linii prawidłowej (HLMEC - SI_A , BALB3/T3 - SI_B) przez wartość IC_{50} wyznaczoną dla konkretnej badanej linii nowotworowej:

$$SI = \frac{IC_{50} \text{ linii prawidłowej}}{IC_{50} \text{ linii nowotworowej}}$$

Wartości współczynników selektywności w stosunku do obu prawidłowych komórek ludzkich (SI_A) i mysich (SI_B) przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Obliczone wartości współczynnika selektywności

| Linia nowotworowa | Współczynnik selektywności (SI) | | | | | |
|-------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 1 | | 3 | | Cisplatyna | |
| | SI _A | SI _B | SI _A | SI _B | SI _A | SI _B |
| MCF-7 | 3,91 | 2,11 | 5,69 | 4,79 | 0,11 | 0,79 |
| SK-BR-3 | 2,89 | 1,56 | 4,67 | 3,93 | 0,06 | 0,42 |
| T47D | 4,39 | 2,37 | 6,53 | 5,50 | 0,10 | 0,69 |
| HT-29 | 0,40 | 0,21 | 0,85 | 0,72 | 0,07 | 0,47 |
| LoVo | 6,56 | 3,55 | 5,97 | 5,02 | 0,29 | 2,07 |
| LoVo/Dx | 4,99 | 2,70 | 6,75 | 5,68 | 0,14 | 1,00 |
| PC-3 | 3,97 | 2,14 | 2,77 | 2,33 | 0,08 | 0,59 |
| Du145 | 3,51 | 1,90 | 3,59 | 3,02 | 0,13 | 0,96 |
| A549 | 3,62 | 1,96 | 3,18 | 2,68 | 0,11 | 0,79 |
| MV-4-11 | 4,50 | 2,43 | 7,09 | 5,97 | 1,14 | 8,07 |

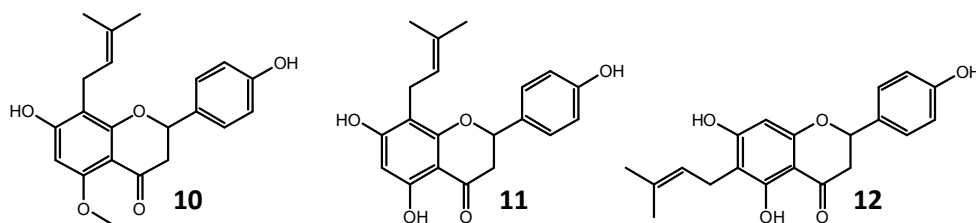
Dane z tabeli, w publikacji **P4** przedstawione są w postaci graficznej (Fig. 3)

Jeśli wartość współczynnika selektywności jest wyższa od 1, oznacza to, że badany związek działa selektywniej wobec komórek nowotworowych niż prawidłowych.

Zarówno chalkon **1** jak i auron **3** wykazują selektywność działania w stosunku do wszystkich badanych ludzkich komórek nowotworowych, za wyjątkiem komórek raka okrężnicy (HT-29), co związane jest z niską aktywnością antyproliferacyjną obu flawonoidów wobec tej właśnie linii. Cisplatyna wobec większości badanych linii nowotworowych działa nieselektywnie bądź bardzo nieselektywnie. Porównywalna aktywność antyproliferacyjna flawonoidów **1** i **3**, a także znacznie niższa cytotoksyczność auronu **3** w stosunku do prawidłowych linii komórkowych sprawia, że związek ten jest bardziej selektywnym środkiem przeciwnowotworowym niż ksantohumol (**1**) w stosunku do komórek nowotworowych piersi (MCF-7, Sk-Br-3, T-47D), raka okrężnicy opornego na doksorubicynę (LoVo/Dx) i białaczki (MV-4-11), podczas gdy w przypadku komórek raka prostaty (PC-3, Du145) i raka płuc (A549), auron **3** charakteryzuje się porównywalną do ksantohumolu (**1**) selektywnością działania.

Przedstawione w publikacji **P4** wyniki wskazują, że zmiana szkieletu flawonoidowego ksantohumolu **1** z chalkonu na auron, nie tylko nie wpłynęła negatywnie na silną aktywność antyproliferacyjną wobec badanych linii komórek nowotworowych, ale znacząco zwiększyła selektywność działania, co sprawia, że auron **3**, może być traktowany jako związek o dużym potencjale przeciwnowotworowym i stanowi ciekawy obiekt do dalszych badań w celu określenia mechanizmów molekularnych jego działania na komórki nowotworowe.

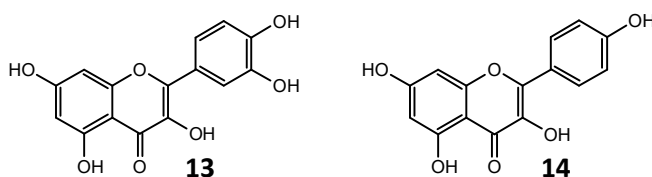
Ksantohumol (**1**) który jest głównym prenyloflawonoidem szyszek chmielowych stanowi około 80-90% całości flawonoidów¹⁹. Pozostałe flawonoidy należące do tej grupy, m.in. prenylowane flawanony takie jak izoksantohumol (**10**), 8-prenylonaringenina (**11**) i 6-prenylonaringenina (**12**), których struktury przedstawiono na rysunku 5, również wykazują silną aktywność biologiczną.



Rysunek 5. Prenylowane flawanony chmielu zwyczajnego: izoksantohumol (**10**), 8-prenylnaringenina (**11**) i 6-prenylnaringenina (**12**)

Związki te mają duże znaczenie ze względu na swoje unikalne właściwości biologiczne, w tym przede wszystkim, aktywność estrogeną (związki **11** i **12**) oraz fakt, iż stanowią ważny składnik ludzkiej diety ze względu na ich obecność w piwie, którego spożycie w takich krajach jak Czechy, Niemcy czy Austria przekracza 100 litrów na osobę na rok ⁵³. Izoksantohumol (**10**) jest głównym prenylowanym flawonoidem piwa, powstaje bowiem na skutek termicznej izomeryzacji ksantohumolu (**1**) w trakcie gotowania brzeczki z chmielem, z kolei 6-prenylo- (**12**) i 8-prenylnaringenina (**11**) wykazują silne właściwości estrogenne, przy czym ten ostatni jest za najsilniejszy fitoestrogen jaki kiedykolwiek wyizolowano z roślin ⁵⁴. Spożywany wraz z piwem izoksantohumol (**10**) jest metabolicznym prekursorem 8-prenylnaringeniny (**11**), która powstaje w wyniku działania wątrobowego cytochromu CYP1A2 oraz mikroflory jelitowej ⁵⁵. Ze względu na silną aktywność estrogeną prenyloflawonoidów chmielowych oraz ich obecność w piwie w artykule przeglądowym **P2** przedstawiono stan aktualnych badań w zakresie fitoestrogenów z chmielu, w której zaprezentowano również własne badania ^{33, 56} (Zał. 3., II, 4.19. oraz 4.20.). Oprócz przedstawienia biosyntezy głównego prenylowanego flawonoidu chmielu – ksantohumolu (**1**), pokazano również ścieżkę tworzenia kwercetyny, bioaktywnego, nieprenylowanego flawonoidu chmielu (Fig. 1, **P2**), będącego przedmiotem badań opisanych w publikacji **P5**.

Kwercetyna (**13**) wraz kemferolem (**14**), przedstawione na rysunku 6, stanowią główne flawonole tej cennej rośliny ⁵⁷.



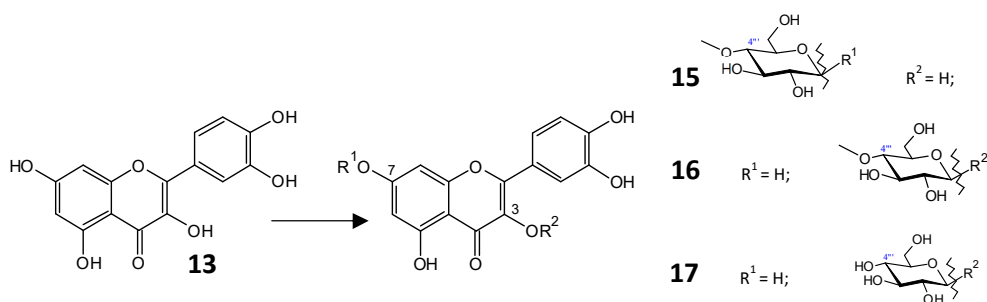
Rysunek 6. Główne flawonole chmielu zwyczajnego: kwercetyna (**13**) i kemferol (**14**)

Badania nad kwercetyną (**13**) oraz jej glikozylowanymi pochodnymi otrzymanymi metodami biotechnologicznymi realizowano w ramach projektu badawczego SONATA 9 (Zał. 3., II, 9.5.) i opisano, w publikacji **P5**.

Kwercetyna (**13**) oprócz chmielu, występuje również w herbacie, kawie, jabłkach, jagodach, przy czym najwyższą zawartość tego flawonolu odnotowano w cebuli ⁵⁸, dzięki czemu, jest powszechnym flawonoidem ludzkiej diety. Związek ten wykazuje silną aktywność biologiczną m.in.: przeciwutleniającą, przeciwzapalną, przeciwalergiczną, przeciwnowotworową,

przeciwdrobnoustrojową i przeciwwirusową, w tym przeciwko koronawirusom SARS-CoV-2 i MERS-CoV⁵⁸⁻⁶⁰. Podobnie jak w przypadku innych aktywnych flawonoidów, jej potencjał terapeutyczny limitowany jest m.in. niską biodostępnością, związaną ze słabą rozpuszczalnością w wodzie, szybkim metabolizmem oraz krótkim okresem półtrwania⁶⁰. Rozpuszczalność kwercetyny (**13**) w wodzie wynosi zaledwie 0,512 mg/L³⁹, podczas gdy 3-*O*-rutynozyd kwercetyny (rutyna) rozpuszcza się 240 razy lepiej (125 mg/L) niż jej aglikon **13**⁶¹, co jednoznacznie dowodzi, że obecność dużego polarnego podstawnika w strukturze flawonoidu znacząco zwiększa jego rozpuszczalność w wodzie. Obecność fragmentu cukrowego może wpływać na zwiększenie biodostępności flawonoidów poprzez polepszenie ich wchłaniania, przy czym fundamentalne znaczenie ma rodzaj przyłączonego cukru. W badaniach przeprowadzonych na psach rasy Beagle wykazano, że biodostępność 3-*O*-glukozydu kwercetyny (izokwercetyny) była wyższa (235%) niż aglikonu kwercetyny (**13**), natomiast rutyna absorbowała się już tylko w 92%^{40, 62}. Z kolei badania przeprowadzone na szczurach wskazują, że biodostępność glukozydu wynosi 185%, podczas gdy ramnozydu kwercetyny poniżej 25%⁶³. Największe różnice w biodostępności zaobserwowano u ludzi, gdzie przy dawce 500 mg/kg masy ciała całkowita ilość przyswojonej kwercetyny (**13**) wyniosła 3,8 h x μmol/L (AUC_{0→24h}), a izokwercetyny aż 18,3 h x μmol/L (482%)⁶⁴. Wyniki te wskazują na dominującą rolę cząsteczki glukozy w zwiększaniu wchłanianiu kwercetyny (**13**). Dowiedziono, że glukozydy kwercetyny są substratami dla laktazy (EC 3.2.1.108)⁶⁵. Enzym ten, znajdujący się m.in. w kosmkach jelitowych, katalizuje hydrolytyczny rozpad wiązań glikozydowych w glukozydach wielu flawonoidów, w tym kwercetyny (**13**), dzięki czemu jest ona enzymatycznie uwalniana z postaci glukozydu do aglikonu i wchłaniana głównie w jelicie cienkim, co znacząco zwiększa biodostępność kwercetyny (**13**) z jej glukozydów.

W publikacji **P5**, przedstawiono badania dotyczące biotechnologicznych metod otrzymywania glikozydów kwercetyny (**13**) z wykorzystaniem biotransformacji w kulturach entomopatogennych grzybów strzępkowych, w wyniku których otrzymano trzy glukozydy kwercetyny (**15-17**).

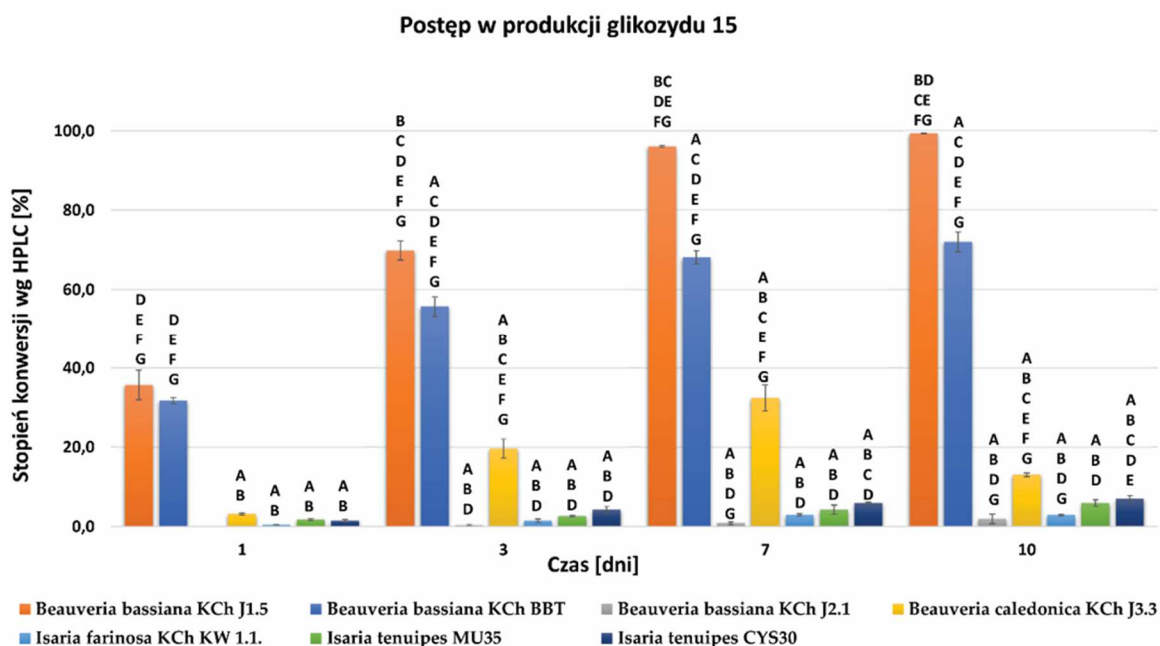


Rysunek 7. Biotransformacje kwercetyny (**13**), w kulturach entomopatogennych grzybów

W wyniku mikrobiologicznych transformacji prowadzonych przez entomopatogenne grzyby otrzymano trzy metabolity kwercetyny: 7-*O*-β-D-4''-*O*-metyloglukopiranozyd kwercetyny (**15**), 3-*O*-β-D-4''-*O*-metyloglukopiranozyd kwercetyny (**16**) i 3-*O*-β-D-glukopiranozyd kwercetyny (**17**) (izokwercetyna) (Rys. 7). Związki powstały w wyniku regioselektywnego przyłączenia cząsteczki 4-*O*-metyloglukozy w pozycjach C7-OH (**15**) i C3-OH (**16**) oraz glukozy w pozycji C3-OH (**17**). Otrzymane metabolity są znane i zostały wcześniej otrzymane w wyniku biotransformacji kwercetyny (**13**), przez szczep *Beauveria bassiana* AM278 – glukozyd **15**⁶⁶ (Zał. 3, II, 4.16) oraz *Isaria fumosorosea* KCh J2 –

glukozydy **16** i **17**⁶⁷, ponadto związek **17** (izokwercetyna) występują naturalnie m.in. w mango oraz rosnącej w Himalajach na wysokości powyżej 4000 m n.p.m. roślinie *Rheum rhabarbarum*⁶⁸. Do badań wykorzystano piętnaście szczepów mikroorganizmów należących do rodzajów *Beauveria*, *Isaria*, *Metapochonia*, *Lecanicillium* oraz *Metarhizium*, z czego pięć wyizolowanych z owadów szczepów opisano jako biokatalizatory po raz pierwszy, były to grzyby *Beauveria feline* ENC3, *Isaria tenuipes* MU35, *I. tenuipes* CYS30, *Metapochonia bulbillosa* CYS17, *Metarhizium anisopliae* MU4.

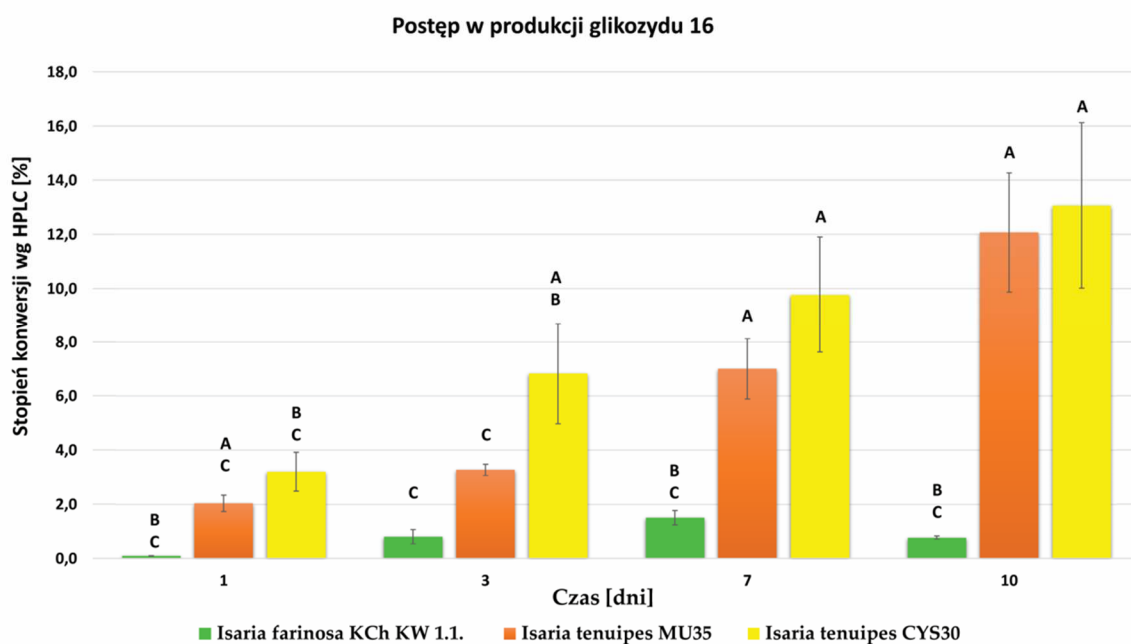
Najbardziej efektywnymi biokatalizatorami wytwarzającymi glukozyd **15** były grzyby *B. bassiana* KCh J1.5 i *B. bassiana* KCh BBT (99% i 72% po 10 dniach transformacji, wg. HPLC). Postęp w produkcji glukozydu **15**, przedstawiono na rysunku 8.



Rysunek 8. Postęp produkcji glikozydu **15** w czasie

Różnice istotne statystycznie przy wartości $p < 0,05$: **A** - vs otrzymywanie związku **15** przez *B. bassiana* KCh J1.5; **B** - vs *B. bassiana* KCh BBT; **C** - vs *B. bassiana* KCh J2.1; **D** - vs *B. caledonica* KCh J3.3; **E** - vs *I. farinosa* KCh KW 1.1; **F** - vs *I. tenuipes* MU35; **G** - vs *I. tenuipes* CYS30

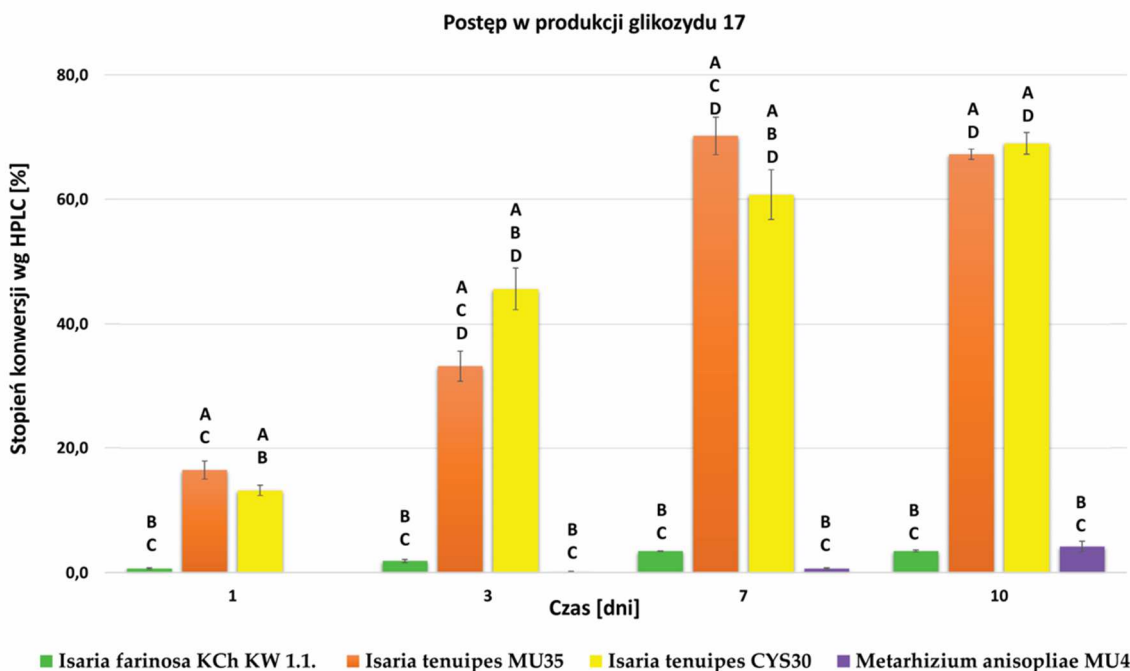
Do produkcji 3-O-β-D-4''-O-metyloglukopiranozydu kwercetyny (**16**) zdolne były wyłącznie grzyby z rodzaju *Isaria*, przy czym najefektywniejsze były szczepy z gatunku *I. tenuipes* MU35 i CYS30 (12-13% po 10 dniach biotransformacji).



Rysunek 9. Postęp produkcji glikozydu **16** w czasie

Różnice istotne statystycznie przy wartości $p < 0,05$: **A** - vs otrzymywanie związku **16** przez *I. farinosa* KCh KW 1.1; **B** – vs *I. tenuipes* MU35; **C** – vs *I. tenuipes* CYS30

Dwa z testowanych biokatalizatorów, *I. tenuipes* MU35 i *I. tenuipes* CYS30, charakteryzowały się zdolnością do produkcji izokwercetyny (**17**). Pomimo różnic w wydajności obserwowanej przez pierwsze 7 dni biotransformacji, po 10 dniach ilość produktu była podobna, co może być związane z niewielką degradacją produktu **17** w kulturach grzybów *I. tenuipes* MU35 (Rys. 10.).



Rysunek 10. Postęp produkcji glikozydu **17** (izokwercetyny) w czasie

Różnice istotne statystycznie przy wartości $p < 0,05$: **A** - vs otrzymywanie związku **17** przez *I. farinosa* KCh KW 1.1; **B** – vs *I. tenuipes* MU35; **C** – vs *I. tenuipes* CYS30; **D** – vs *M. anisopliae* MU4

Produkt **15** otrzymano wcześniej w wyniku biotransformacji kwercetyny (**13**) przez szczep *B. bassiana* AM278, co umożliwiło określenie jego aktywności w testach *in vitro*: zdolności wiązania do ludzkiej albuminy krwi, aktywności przeciwzapalnej, zdolności do interakcji i penetracji podwójnej błony fosfolipidowej⁶⁶ (Zał. 3, II, 4.16.). Niniejsza praca stanowiła fragment rozprawy doktorskiej, w której pełniłem funkcję **promotora pomocniczego**.

Biotechnologiczna metoda otrzymywania 3-*O*-glukozydu kwercetyny **17** (izokwercetyny), z wysoką, około 70-procentową wydajnością przez szczepy *Isaria tenuipes* (MU35 i CYS30) zasługuje na szczególną uwagę, nie tylko dlatego, że izokwercetyna (**17**) wchłaniania się blisko 5-krotnie lepiej od kwercetyny (**13**)⁶⁴, ale posiada również silne właściwości przeciwwirusowe, może zatem stać się przedmiotem zainteresowania firm farmaceutycznych poszukujących skutecznych leków przeciwwirusowych. W literaturze przedmiotu można znaleźć informacje, że izokwercetyna (**17**) hamuje wirusy grypy A i B (IAV, IBV) 40-krotnie silniej niż kwercetyna (**13**), a w kombinacji z lekami przeciwwirusowymi znosi odporność wirusa na leki^{59,69}. Skuteczniej od aglikonu **13** hamuje również wirusa ptasiej grypy H5N1⁷⁰. Ponadto, wykazuje silną aktywność przeciwko przenoszonym przez komary wirusom Zika (ZIKV) i Dengi (DENV)⁷¹⁻⁷². Z kolei badania przeprowadzone na myszach dowiodły skutecznego działania izokwercetyny (**17**) przeciwko wysoce śmiertelnemu wirusowi Ebola (EBOV) (IC₅₀ = 5,3 μM, IC₉₀ = 9,3 μM). Dootrzewnowe wstrzykiwanie izokwercetyny (**17**) w dawce 50 mg/kg masy ciała 30 minut przed zakażeniem śmiertelną dawką wirusa, ponawiane co drugi dzień, chroniło 90-100% zwierząt przed śmiercią, co czyni izokwercetylne (**17**) jednym z najskuteczniejszych kandydatów na lek przeciwko wirusowi Ebola⁷³. Skuteczność izokwercetyny (**17**) opisano również przeciwko koronawirusom SARS-CoV, MERS-CoV oraz SARS-CoV-2, który wywołał ogólnoswiatową pandemię i stał się przyczyną śmierci blisko dziesięciu milionów ludzi⁵⁹ oraz wirusom opryszczki (HSV-1 i HSV-2)⁷⁴, ospy wietrznej i półpaśca (VZV) oraz ludzkiemu wirusowi cytomegalii (HCMV)⁷⁵.

Kwercetyna (**13**) oraz otrzymane glukozydy **15-17**, stały się przedmiotem badań *in silico* z wykorzystaniem narzędzi chemoinformatycznych, służących do przewidywania parametrów farmakokinetycznych oraz właściwości farmakodynamicznych przydatnych w chemii medycznej m.in. do projektowania nowych leków. W tym celu wykorzystano oprogramowanie SwissADME opracowane przez Grupę Modelowania Molekularnego Szwajcarskiego Instytutu Bioinformatyki (ang. Molecular Modeling Group of the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)) do kalkulacji rozpuszczalności w wodzie oraz parametrów ADME (wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania) oraz platformę Way2Drug PASS Online umożliwiającą bioinformatyczne przewidywanie najbardziej prawdopodobnych aktywności biologicznych wynikających z budowy molekularnej potencjalnego leku.

Na podstawie wyników badań farmakokinetycznych wykazano, że otrzymane produkty (**15-17**) mają znacząco niższą lipofilowość oraz znacznie większą rozpuszczalność w wodzie. Glukozydy **15** i **16** blisko 18-krotnie, a metabolit **17** 84-krotnie wyższą rozpuszczalność w wodzie niż kwercetyna (**13**), co związane jest z obecnością polarnej cząsteczki cukrowca w strukturze tych produktów. Na podstawie wyników przewidywań farmakokinetycznych *in silico* zarówno badany substrat (**13**), jak i otrzymane produkty (**15-17**) nie powinny biernie przenikać przez barierę krew/mózg. Natomiast kwercetyna (**13**) może biernie przenikać przez barierę jelito-krew, podczas gdy, glukozydy **15-17** tej właściwości nie mają. W efekcie obliczona biodostępność glukozydów **15-17** jest znacznie niższa niż kwercetyny (**13**).

Przewidywane wyniki biodostępności produktów **15-17** przeczą ogólnie przyjętej tezie, potwierdzonej badaniami *in vivo*, że glukozydy kwercetyny są zdecydowanie lepiej przyswajalne niż aglikon kwercetyna (**13**)^{64,76}. Różnice w wynikach *in silico* i uzyskanych *in vivo* są prawdopodobnie związane z metodologią określania właściwości fizykochemicznych dotyczących tylko charakterystycznych fragmentów cząsteczki (deskryptorów) w badaniach *in silico*. W rezultacie przewidywana zwiększona hydrofilowość glukozydów kwercetyny (**15-17**) skutkuje jednocześnie zmniejszoną lipofilowością cząsteczek, co zmniejsza powinowactwo do błon biologicznych i utrudnia bierny transport przez barierę jelitową. W oparciu o badania *in silico*, glikozylacja może hamować bierne przenikanie glikozydów do krwiobiegu, co potwierdzono w badaniach *in vivo*, ale wyłącznie dla glikozydów nie będących glukozydami kwercetyny – rutynozydu i ramnozydu kwercetyny^{40,62-63}. Glikozylacja zwiększa stabilność i rozpuszczalność kwercetyny w wodzie, dzięki czemu związki te efektywniej przechodzą przez żołądek do jelita niż aglikon **13**. Obecność enzymu laktazy (LPH, EC 3.2.1.108), która rozpoznaje cząsteczki glukozy i hydrolizuje wiązania O-glikozydowe w glukozydach kwercetyny, przekształca je do bardziej lipofilowej, łatwiej penetrującej błonę mikrokosmków jelitowych, przez co lepiej wchłanianej, kwercetyny (**13**)⁶⁵. Ponadto, obecność zależnych od jonów sodu transporterów glukozy (białka SGLT1), odpowiedzialnych za absorpcję glukozy w jelitach, powoduje aktywny transport glukozydów kwercetyny w poprzek błony enterocytów⁷⁷⁻⁷⁸, przy czym duże znaczenie ma tutaj pozycja glikozylacji, wykazano bowiem, że 4'-O-glukozyd kwercetyny transportowany jest zarówno aktywnie z wykorzystaniem transporterów SGLT1 jak i pasywnie w wyniku hydrolizy przez LPH, podczas gdy 3-O-glukozyd kwercetyny (**17**), wyłącznie po uprzedniej hydrolizie prowadzonej przez laktazę⁷⁹. Przewidywania biodostępności *in silico* brały pod uwagę wyłącznie parametry fizykochemiczne badanych związków, w efekcie czego mniej lipofilowe glukozydy (**15-17**) powinny być gorzej wchłaniane od aglikonu **13**. Metody obliczeniowe nie zakładały bowiem, dodatkowych mechanizmów molekularnych towarzyszących przenikaniu glukozydów kwercetyny przez błonę enterocytów (LPH i SGLT1), dowodzi to, że narzędzia chemoinformatyczne określania parametrów farmakokinetycznych aktywnych związków muszą być nadal rozwijane i dopracowywane.

Bioinformatyczne przewidywania najbardziej prawdopodobnych aktywności biologicznych oraz cytotoksyczności otrzymanych glukozydów (**15-17**) i kwercetyny (**13**) wykonano z wykorzystaniem platformy Way2Drug: PASS Online oraz GUSAR. Aktywności przedstawiono w tabeli 3, publikacji **P5**. Aktywności te są zgodne z badaniami przeprowadzonymi empirycznie i pokazują, że kwercetyna (**13**) może działać m.in. przeciwko chorobom sercowo-naczyniowym (CVD)⁸⁰⁻⁸³. Badania potwierdziły, że również izokwercetyna (**17**) może być potencjalnym środkiem terapeutycznym dla CVD⁸⁴. W oparciu o dane zebrane w tabeli 3 (**P5**), podobną aktywność powinny wykazywać również O-metylo-glikozydy kwercetyny **15** i **16**, aby potwierdzić te działania, kluczowe jest jednak przeprowadzenie badań *in vitro* i *in vivo*.

Przedstawione w publikacji **P5** nowoczesne narzędzia chemoinformatyczne mogą przyspieszyć proces badań przesiewowych dla struktur wiodących, będących podstawą do szukania farmakoforów dla nowych leków. Narzędzia obejmujące przewidywanie parametrów farmakokinetycznych, takich jak biodostępność i wchłanianie oraz potencjalnych aktywności biologicznych mogą znacząco skrócić czas i usprawnić poszukiwanie nowych bioaktywnych związków, dzięki czemu przyczynić się do szybszej

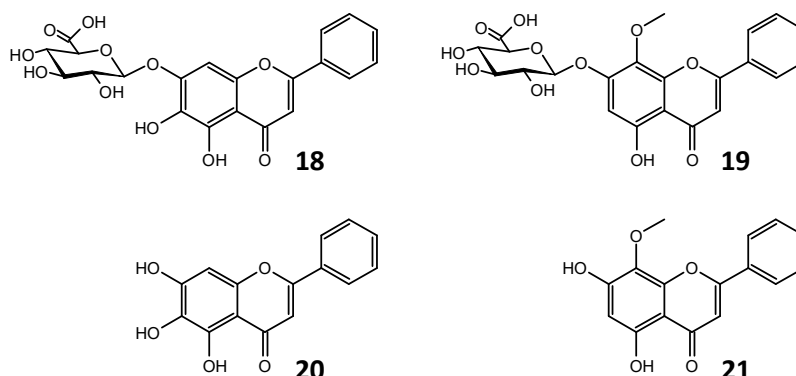
oceny ich potencjału terapeutycznego. Nie mniej jednak to badania *in vivo*, *in vitro* oraz kliniczne są fundamentalne dla badania właściwości związków i nadal pozostają niezbędne do kompleksowego zrozumienia aktywności biologicznej, cytotoksyczności i molekularnych mechanizmów działania potencjalnych nowych leków. Przeprowadzone przewidywania *in silico* potencjalnej aktywności biologicznej glukozydów kwercetyny **15-17**, umożliwiły określenie kierunków badań w jakich związki te powinny być w przyszłości testowane.

Otrzymywanie i biotransformacje flawonoidów z tarczycy bajkalskiej (*Scutellaria baicalensis* Georgi)

Badania objęte powyższym tematem zostały opisane w składającej się na osiągnięcie naukowe publikacji:

P3. Tronina, T*, Mrozowska, M., Bartmańska, A., Popłoński, J., Sordon, S., Huszcza, E. (2021). Simple and rapid method for wogonin preparation and its biotransformation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8973. DOI: 10.3390/ijms22168973

Tarczycza bajkalska (*Scutellaria baicalensis* Georgi) jest jednym z najczęściej stosowanych ziół w tradycyjnej medycynie chińskiej. Roślina ta pochodzi i jest szeroko rozpowszechniona w Azji, w krajach takich jak Chiny, Japonia, Kora Północna, Rosja i Mongolia. Ze względu na swoje lecznicze właściwości obecnie aklimatyzowana i uprawiana jest również w warunkach środkowoeuropejskich, gdzie staje się coraz bardziej popularna i wykorzystywana jako nutraceutyk. Jako tradycyjny lek chiński, wykorzystywany jest głównie suchy korzeń tarczycy (*Radix Scutellariae*), który stosowany jest przy leczeniu biegunek, wymiotów, wysokiego ciśnienia krwi oraz infekcji bakteryjnych i wirusowych⁸⁵. Szczególne zainteresowanie badaczy budzą właściwości przeciwwirusowe, wykazano bowiem, że tarczycza hamuje wirusy: HIV⁸⁶⁻⁸⁷, grypy typu A i B (IVA, IVB)⁸⁸, żółtaczkę typu B (HBV)⁸⁹ i typu C (HCV)⁹⁰, oraz herpeswirusy: opryszczki (HSV-1, HSV-2) oraz jednego z najpowszechniej występującego u ludzi wirusa Epsteina-Barr (EBV, HHV-4)⁹¹. Najnowsze badania dowiodły również, że związki z tarczycy bajkalskiej, wykazują zdolność hamowania koronawirusa SARS-CoV-2, odpowiedzialnego za COVID-19⁹²⁻⁹⁶.



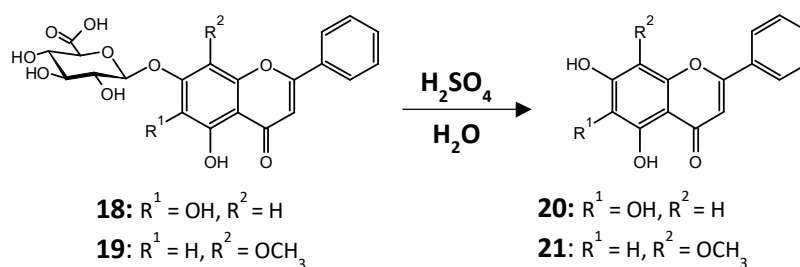
Rysunek 11. Główne flawonoidy korzenia tarczycy bajkalskiej: bajkalina (**18**), wogonozyd (**19**), bajkaleina (**20**) i wogonina (**21**)

Wysoka aktywność biologiczna korzenia tarczycy przypisywana jest głównie obecności flawonoidów jakie w nim występują, glukuronidom: bajkalinie (**18**) i wogonozydowi (**19**) oraz ich

aglikonom: bajkaleinie (**20**) i wogoninie (**21**), których struktury przedstawiono na rysunku 11. Zawartość poszczególnych flawonoidów zależy w dużej mierze od odmiany oraz warunków geograficznych i klimatycznych, w jakich uprawiane są rośliny. Ich zawartość w suchym korzeniu tarczycy może wynosić odpowiednio: bajkalina (**18**) do ponad 11%, wogonozyd (**19**) do 5%, bajkaleina (**20**) do 1,5% oraz wogonina (**21**) do 0,35%⁹⁷⁻⁹⁹. Wyższą aktywność biologiczną, w tym m.in. anty SARS-CoV-2, przypisuje się formom pozbawionym reszty kwasu glukuronowego **20** i **21**, jednak, ze względu na niewielką, kilkukrotnie niższą w porównaniu do glukuronidów, zawartość tych związków w tarczycy, możliwość ich terapeutycznego zastosowania jest limitowany wysoką ceną i niską dostępnością rynkową. Dlatego intensywnie poszukuje się nowych, efektywnych i tanich metod otrzymywania tych cennych związków.

W publikacji **P3** opisano badania nad opracowaniem taniej i szybkiej metody otrzymywania bajkaleiny (**20**) oraz wogoniny (**21**) bezpośrednio z suchego korzenia tarczycy bajkalskiej. Uzyskany w ten sposób aglikon **21** poddano modyfikacji z wykorzystaniem metod biotechnologicznych, otrzymując pochodne o aktywności biologicznej w tym m.in. przeciwnowotworowej. Izolowanie aglikonów z tarczycy, a w szczególności wogoniny (**21**), ze względu na jej bardzo niską zawartość jest procesem żmudnym, czasochłonnym, nieefektywnym i kosztownym. Z kolei otrzymywanie wogoniny (**21**) na drodze hydrolizy z wogonozydu (**19**) wymaga izolowania z tarczycy bajkalskiej czystego glukuronidu **19**, co często komplikuje proces i znacząco podwyższa koszty, ponadto generuje duże ilości odpadów w postaci zużytych rozpuszczalników organicznych. Znane są metody chemicznej syntezy wogoniny (**21**), jednak wydajność tego procesu jest relatywnie niska (24%), a w trakcie syntezy w znacznie większej ilości (46%), powstaje trudny do oddzielenia izomer wogoniny (**21**) – oroksyлина A, co dyskwalifikuje ten proces do zastosowania przemysłowego¹⁰⁰.

W pracy **P3**, opisującej badania realizowane w ramach projektu badawczego SONATA 9 (Załącznik 3., II, 9.5.), zaproponowano szybką, prostą, taną i skuteczną metodę otrzymywania czystej bajkaleiny (**20**) oraz wogoniny (**21**). Zakłada ona szybki, jednoczesny i wydajny proces hydrolizy bajkaliny (**18**) do bajkaleiny (**20**) (stopień konwersji 91%) oraz wogonozydu (**19**) do wogoniny (**21**) (stopień konwersji 99%). Innowacja tego procesu polega na tym, że zamiast czystych, wyizolowanych z tarczycy glukuronidów bajkaleiny (**18**) i wogonozydu (**19**) do hydrolizy stosuje się tani, dostępny w handlu, suchy sproszkowany korzeń tarczycy bajkalskiej jako źródło glukuronidów **18** i **19**, z pominięciem etapu czasochłonnego i kosztownego izolowania i separacji czystych flawonoidów **18** i **19** jako prekursorów aglikonów **20** i **21**. Mieszanina poreakcyjna jest następnie selektywnie ekstrahowana w celu wzbogacenia ekstraktu w pożądane związki oraz usunięcia znacznych ilości produktów ubocznych powstałych po hydrolizie całego korzenia. Przygotowany w ten sposób, wzbogacony w aglikony **20** i **21** ekstrakt jest oczyszczany do czystych związków za pomocą prostych, znanych metod, np. chromatografii flash lub krystalizacji. Opracowana metoda zapewnia szybkie otrzymanie gramowych ilości bajkaleiny (**20**) i wogoniny (**21**), które można łatwo i tanio uzyskać z ogólnie dostępnego surowca – całego korzenia tarczycy bajkalskiej.



Rysunek 12. Hydroliza głównych glukuronidów **18** i **19** korzenia tarczycy bajkalskiej

Opracowana metoda otrzymywania bajkaleiny (**20**) oraz wogoniny (**21**) o czystości $\geq 98\%$) opiera się na kwasowej hydrolizie suchego, sproszkowanego korzenia tarczycy za pomocą czystego kwasu siarkowego(VI) oraz wody destylowanej w stosunku 1:1. Po zakończonym procesie reakcję przerywa się poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjnej lodowatej wody destylowanej w stosunku objętościowym od 5:1 do 15:1. Dużymi zaletami opracowanej metody są:

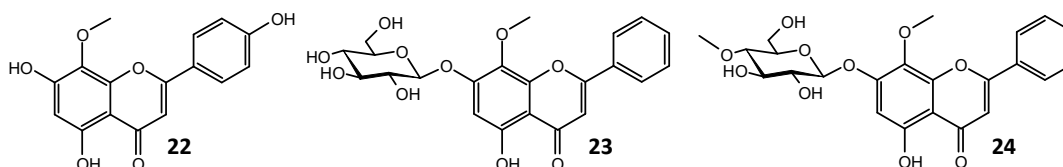
- 1) brak konieczności grzania reakcji, gdyż w wyniku wkraplania wody destylowanej o znacznie niższej gęstości ($d = 0,998 \text{ g/cm}^3$ w temp. $20 \text{ }^\circ\text{C}$) w stosunku do mieszaniny reakcyjnej korzenia tarczycy rozpuszczonego w czystym kwasie siarkowym(VI) ($d = 1,83 \text{ g/cm}^3$ czystego H_2SO_4 w temp. $20 \text{ }^\circ\text{C}$), wydziela się znaczna ilość ciepła,
- 2) krótki czas reakcji (przy 15 gramach korzenia czas reakcji wynosi 25 min.),
- 3) duży ubytek masy niepożądanych składników (przy 15 gramów korzenia ubytek masy po reakcji wynosi blisko 47%, co świadczy o tworzeniu dużej ilości rozpuszczalnych w wodzie produktów ubocznych, które nie są zatrzymywane w precipitacie zawierającym flawonoidy).

Pomimo dużego ubytku masy otrzymany po reakcji hydrolizat wciąż zawiera relatywnie dużą ilość produktów ubocznych. W celu zmniejszenia ilości rozpuszczalników oraz złoży niezbędnych do oczyszczania metodami chromatograficznymi, otrzymany hydrolizat poddano procesowi ekstrakcji w układzie ciecz-ciało stałe, z wykorzystaniem sześciu komercyjnie dostępnych rozpuszczalników organicznych posiadających zdolność do rozpuszczania flawonoidów. W wyniku selektywnej ekstrakcji najlepsze wyniki (najmniejsza ilość otrzymanego ekstraktu, a zarazem najwyższe ilości bajkaleiny (**20**) i wogoniny (**21**) w przeliczeniu na 1000 mg otrzymanego ekstraktu) zaobserwowano dla eteru dietylowego oraz octanu etylu. Ponieważ niska temperatura wrzenia eteru dietylowego, która wynosi poniżej $35 \text{ }^\circ\text{C}$ przy ciśnieniu atmosferycznym, może przysparzać trudności np. ryzyka wybuchu przy przeniesieniu/prowadzeniu procesu na większą skalę, dlatego ostatecznie, jako selektywny rozpuszczalnik flawonoidów po procesie hydrolizy wybrano octan etylu, który pozwalał na ekstrakcję ponad 470 mg bajkaleiny (**20**) oraz blisko 330 mg wogoniny (**21**) z 1000 mg otrzymanego ekstraktu. Frakcja wszystkich flawonoidów otrzymanych w wyniku ekstrakcji hydrolizatu stanowiła powyżej 80%, co znacząco obniża ilości wykorzystanych rozpuszczalników oraz złoży do oczyszczania związków metodami chromatograficznymi. Ma to pozytywny wpływ na środowisko (mniejsza ilość odpadów) oraz obniża koszty samego procesu separacji. Wykorzystując zautomatyzowany system błyskawicznej chromatografii Flash do oczyszczania ekstraktu hydrolizatu, z 15 gramów suchego korzenia otrzymano ostatecznie 152 mg bajkaleiny (**20**) oraz 109 mg wogoniny (**21**), co w przeliczeniu na 100 gramów

taniego, ogólnie dostępnego korzenia tarczycy, daje odpowiednio ponad 1000 mg bajkaleiny (**20**), oraz 720 mg relatywnie drogiego aglikonu wogoniny (**21**) (cena za 25 mg monohydratu wogoniny o czystości 98% wynosi 4700 zł netto, źródło: <https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl> ; produkt numer: w0769 Merck, Darmstad, Niemcy, dane z 09.09.2023).

Wogonina (**21**) uzyskana za pomocą opisanej powyżej metody wykorzystana została jako substrat do otrzymania pochodnych metodami biotechnologicznymi na drodze biotransformacji. Jak do tej pory, ukazała się tylko jedna publikacja w której jako substrat do reakcji biotransformacji zastosowano wogoninę (**21**) do śledzenia metabolizmu (glukuronidacji) flawonu **21** do wogonozydu (**19**) w mikrosomach wątrobowych i jelitowych człowieka, małpy, psa, szczura i myszy¹⁰¹. Brak innych publikacji dotyczących biotransformacji wogoniny (**21**) może świadczyć o tym, że jak dotąd nie opracowano taniej i wydajnej metody otrzymywania tego bioaktywnego aglikonu tarczycy bajkalskiej, co potwierdza wagę opisanego w publikacji **P3** szybkiego, niedrogiego i wydajnego sposobu otrzymywania wogoniny (**21**) w gramowych ilościach.

Wogoninę (**21**) poddano biotransformacjom skринingowym w celu wyłonienia efektywnych biokatalizatorów. W tym celu przebadano trzydzieści pięć szczepów grzybów strzępkowych oraz jeden szczep drożdży. Dwadzieścia z nich wykazywała zdolność do biotransformacji wogoniny (**21**), dwa degradowały ją, a czternaście nie było zdolnych do przekształcenia tego substratu. Szczepy najefektywniej przekształcające wogoninę (**21**) zastosowano do przeprowadzenia biotransformacji w powiększonej skali, w wyniku których wyizolowano i określono struktury trzech metabolitów (**22-24**) przedstawionych na rysunku 13.



Rysunek 13. Produkty (**22-24**) metabolizmu wogoniny (**21**) otrzymane w kulturach wybranych grzybów strzępkowych

Sposoby otrzymywania przedstawionych na rysunku 13 produktów przez najefektywniejsze biokatalizatory zostały zgłoszone do ochrony w Urzędzie Patentowym RP (Zał. 3., III, 3.2.14., 3.2.15., 3.2.16., 3.2.17., 3.2.18.).

Biotransformacje wogoniny (**21**) w kulturach grzybów *Absidia cylindrospora* AM336 oraz należących do rodzaju *Mortierella* oraz *Penicillium* prowadziły do regioselektywnej hydroksylacji w pierścieniu B (pozycja C4'), w efekcie której otrzymano produkt fazy I metabolizmu - 4'-hydroksywogoninę (**22**) z wydajnością od 4,5% do 38%, w zależności od wykorzystanego biokatalizatora. Związek ten w niewielkich ilościach naturalnie występuje w roślinach, np. w niektórych gatunkach *Scutellaria*¹⁰²⁻¹⁰³ oraz wykazuje silną aktywność biologiczną. Najnowsze badania pokazały, że 4'-hydroksywogonina (**22**) hamuje indukowane lipopolisacharydem odpowiedzi zapalne w makrofagach RAW 264.7 oraz u myszy z ostrym uszkodzeniem płuc¹⁰⁴. Wykazuje również aktywność

przeciwnowotworową poprzez hamowanie angiogenezy raka jelita grubego ¹⁰⁵. Indukuje apoptozę oraz hamuje proliferację komórek ludzkiej ostrej białaczki limfoblastycznej ¹⁰⁶. Opisano również silną aktywność przeciwwirusową *in vivo* tego związku przeciwko wirusom grypy typu A i B ¹⁰⁷. Zaproponowana biotechnologiczna metoda otrzymywania 4'-hydroksywogoniny (**22**) z wogoniny (**21**), może okazać się zatem skuteczną alternatywą w produkcji tego rzadkiego flawonoidu do badań biologicznych, w stosunku do izolowania z roślin w których występuje tylko w niewielkich ilościach.

Oprócz metabolitów fazy I (funkcjonalizacji) obserwowano również produkty fazy II metabolizmu (sprzęgania). W wyniku regioselektywnej glikozylacji w pozycji C7-OH w pierścieniu A, przyłączana była β -D-glukopiranoza (produkt **23**) lub jej 4-O-metylowa pochodna (metabolit **24**). Spośród przetestowanych mikroorganizmów sześć sprzęgało wogoninę (**21**) z glukozą (metabolit **23**). Najskuteczniejszym biokatalizatorem tej reakcji był szczep *Cunninghamella japonica* AM472 (stopień przereagowania blisko 54%), pozostałe grzyby z rodzajów *Absidia*, *Beauveria* i *Mucor* prowadziły reakcję z wyraźnie niższą wydajnością (6,5% – 25,3%). Z kolei zdolność do przyłączania 4-O-metyloglukozy (produkt **24**) posiadały tylko grzyby *Beauveria bassiana* AM278, które wytwarzały jednocześnie oba glukozydy **23** i **24**, natomiast inne zdeponowane w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy UPWr grzyby należące do tego samego gatunku *Beauveria bassiana* AM737 degradowały wogoninę (**21**). Reakcje glikozylacji wogoniny (**21**), mogą być pożądane, gdyż podobnie jak w przypadku innych aktywnych flawonoidów o niskiej biodostępności, poprzez zwiększenie rozpuszczalności w wodzie mogą mieć istotny wpływ na przyswajanie wogoniny (**21**) z układu pokarmowego. Otrzymanie w kulturze grzybów *Beauveria bassiana* AM278 jednocześnie dwóch glikozylowanych pochodnych (**23** i **24**) z przyłączoną do wogoniny (**21**) cząsteczką glukozy (**23**) oraz 4-O-metylową pochodną glukozy (**24**), jest nietypowe i niezwykle rzadkie. Udowodniono bowiem że *B. bassiana* dla wielu różnych związków, w tym licznych flawonoidów, katalizuje reakcję przyłączenia 4-O-metylowanej pochodnej glukopiranozy do substratu jako głównego i bardzo często jedynego produktu biotransformacji ^{45-46, 66, 108-112} (Zał. 3, II, 4.1., 4.2, 4.4., 4.6., 4.15., 4.16., 4.24., 4.27.). To rzadkie zjawisko sprzęgania zarówno glukozy jak jej metylowej pochodnej zaobserwowano w przypadku biotransformacji flawonoidów z niepodstawionym pierścieniem B, takich jak chryzyna i pinocembryna, co wskazuje na to, że brak grupy hydroksylowej przy C4' (pierścień B) ma fundamentalne znaczenie dla otrzymywania różnych glikozydów przez *B. bassiana* ¹¹³ (Zał. 3, II, 4.22.). Wcześniejsze badania pokazały, że grzyby z rodzaju *Absidia*, *Beauveria*, *Rhizopus* i *Cunninghamella* posiadają wysoce specyficzne glikozylotransferazy, które preferują przyłączanie fragmentów cukrowych głównie w pozycji C7-OH (lub ekwiwalentnych pozycjach C6-OH w auronach, oraz C-4 w chalkonach i α,β -dihydrochalkonach), ^{45-46, 66, 108-112} (Zał. 3, II, 4.1., 4.2, 4.4., 4.6., 4.15., 4.16., 4.24., 4.27.). Wogonina (**21**), posiadająca w swej strukturze niepodstawiony pierścień B oraz dodatkową grupę metoksyłową w pozycji C8, jest zatem bardzo ciekawym obiektem badania procesu glikozylacji w tym jej regioselektywności, gdyż obecność grupy metoksyłowej w bardzo bliskim sąsiedztwie preferowanej przez enzymy pozycji przyłączania grup cukrowych, może stanowić zawadę steryczną i uniemożliwić przyłączenie cukrowca w pozycji C7-OH. Przeprowadzone biotransformacje wogoniny (**21**) uzupełniły i poszerzyły wiedzę na temat wpływu podstawienia pierścieni A i B na mikrobiologiczną glikozylację flawonoidów w tym regioselektywność procesu, potwierdzając, że brak grupy

hydroksylowej w pozycji C4' (pierścień B) prowadzi do wytworzenia dwóch produktów przez grzyby z gatunku *B. bassiana*, oraz że obecność grupy metoksylowej w pozycji C8, nie wpływa na sąsiadującą z nią preferowaną pozycję glikozylacji prowadzoną przez glikozylotransferazy grzybów strzępkowych.

Podsumowanie wyników osiągnięcia naukowego będącego cyklem powiązanych tematycznie artykułów naukowych

Zarówno naturalnie występujący w Polsce chmiel zwyczajny (*Humulus lupulus* L.), jak rosnąca w Azji, a od niedawna uprawiana również w Europie, tarczycza bajkalska (*Scutellaria baicalensis* Gerogi) od zarania dziejów wykorzystywane są jako naturalne leki tradycyjnej medycyny ludowej oraz nutraceutyki. Ich dobroczynne i terapeutyczne działanie przypisuje się głównie obecności rzadkich, bardzo aktywnych związków flawonoidowych. Zawartość najaktywniejszych z nich jest często bardzo niska, co powoduje, że izolowanie i oczyszczanie tych związków jest procesem żmudnym, czasochłonnym, często nieefektywnym oraz nieoptymalnym, z tego względu nieustannie poszukuje się nowych efektywnych metod pozyskiwania tych cennych związków. W wyniku realizacji prac badawczych wchodzącym w skład osiągnięcia:

- 1) udoskonalono metodę izolowania i oczyszczania głównego prenylowanego flawonoidu szyszek chmielowych - ksantohumolu (1) z materiału odpadowego jakim są wychmieliny, dzięki czemu zwiększono jego czystość do 98% przy jednoczesnym rozszerzeniu puli izolowanych związków o inne cenne pod względem biologicznym, prenylowane flawonoidy chmielu, m. in. ksantohumol C i ksantohumol D.**
- 2) opracowano szybką, tanią i efektywną metodę izolowania gramowych ilości najaktywniejszych flawonoidów tarczycy bajkalskiej: bajkaleiny (20) i wogoniny (21), poprzez hydrolizę związków zawartych w całym korzeniu, selektywną ekstrakcję oraz oczyszczanie metodami chromatograficznymi**

Otrzymane w większych ilościach związki mogą posłużyć do badań nad ich aktywnością biologiczną oraz jako materiał wyjściowy do otrzymania ich pochodnych (często nowych) w celu określenia determinantów strukturalnych warunkujących ich wysoką aktywność, co jest niezwykle istotne w uzyskaniu oraz projektowaniu nowych leków. Brak skutecznej i taniej metody pozyskiwania wogoniny (21), dyskwalifikował dotąd wykorzystanie tego cennego flawonoidu jako potencjalnego leku.

Otrzymany z wychmielin ksantohumol (1) posłużył do opracowania metody syntezy nowej, pochodnej należącej do klasy auronów (3), dzięki czemu można było:

- 3) określić wpływ budowy szkieletu prenylowanych flawonoidów (chalkon (1) versus auron (3)) na aktywność antyproliferacyjną i selektywność działania w stosunku do dziesięciu linii komórkowych ludzkich nowotworów i dwóch prawidłowych linii komórkowych**

Otrzymana pochodna wykazuje nie tylko równie wysoką aktywność przeciwnowotworową w tym m.in. przeciwko odpornemu na działania doksorubicyny nowotworowi okrężnicy, jak ksantohumol (1), ale cechuje się wysoką selektywnością działania wobec większości przetestowanych linii komórkowych

ludzkich nowotworów, co czyni ją atrakcyjnym związkiem do dalszych badań nad działaniem przeciwnowotworowym.

Szerokie spektrum działania oraz silna aktywność biologiczna flawonoidów są często limitowane ich niską biodostępnością, co związane jest ze słabą rozpuszczalnością w wodzie, szybkim metabolizmem oraz krótkim okresem półtrwania. W celu zwiększenia stabilności oraz rozpuszczalności flawonoidów w wodzie, poszukuje się modyfikacji wpływających na zwiększenie ich polarności. Bardzo dobrym narzędziem do modyfikacji bioaktywnych związków są metody biotechnologiczne takie jak biotransformacje. Bogaty układ enzymatyczny mikroorganizmów, a w szczególności grzybów strzępkowych, umożliwia prowadzenie modyfikacji ksenobiotycznych substratów z wysoką chemo-, regio- i stereoselektywnością. Grzyby strzępkowe mogą prowadzić reakcje I i II fazy metabolizmu, ale w odróżnieniu od ssaków, u których w fazie II przyłączane są głównie kwas glukuronowy, reszta kwasu siarkowego(VI), aminokwasy lub glutation, grzyby strzępkowe najczęściej regioselektywnie dołączają cząsteczki glukozy i jej pochodne (4-O-metyloglukozę) lub rzadziej resztę kwasu siarkowego(VI). Biotransformacje z wykorzystaniem komórek drobnoustrojów często umożliwiają otrzymanie wystarczających ilości produktu do określenia jego struktury, co pozwala na przewidywanie metabolizmu związku w organizmach ssaków, ale również określenie aktywności biologicznej, wpływu budowy na aktywność oraz cytotoksyczność.

Ksantohumol (**1**), jego dwie pochodne otrzymane na drodze syntezy, auron (**3**) i występujący w niewielkich ilościach w chmielu i wykazujący udowodnioną aktywność przeciwnowotworową *in vitro* α,β -dihydroksantohumol (**2**), oraz występującą naturalnie w chmielu kwercetynę (**13**) poddano biotransformacjom w kulturach grzybów strzępkowych słynących ze swoich zdolności do przyłączania fragmentów cukrowych do cząsteczek flawonoidów, co umożliwiło:

- 4) **określenie wpływu budowy szkieletu prenylowanych flawonoidów oraz obecności polarnego fragmentu cukrowego na aktywność przeciwzapalną wyrażoną jako zdolność hamowania cyklooksygenazy 1 i 2 oraz zdolność wiązania do ludzkiej albuminy surowicy krwi prenylowanych flawonoidów .**
- 5) **otrzymanie z wysoką wydajnością izokwercetyny (**17**), związku o silnej aktywności przeciwwirusowej w tym między innymi anty-Ebola i anty-SARS-CoV-2, która wykazuje 482% wyższe wchłanianie drogą doustną niż jej prekursor kwercetyna (**13**), co stanowić może o jej potencjalnym wykorzystaniu jako lek**

Opracowanie szybkiej, taniej i wydajnej metody otrzymywania wogoniny (**21**) z korzenia tarczycy bajkalskiej umożliwiło:

- 6) **przeprowadzenie po raz pierwszy biotransformacji tego aktywnego związku z udziałem grzybów strzępkowych oraz drożdży**
- 7) **otrzymanie z dobrą wydajnością, na drodze biotechnologicznej, aktywnego biologicznie i rzadkiego flawonoidu jakim jest 4'-hydroksywogonina (**22**)**
- 8) **otrzymanie na drodze biotechnologicznej glukozylowanych pochodnych wogoniny (**23-24**)**
- 9) **określenie wpływu podstawienia pierścienia B na proces mikrobiologicznej glikozytacji**

10) określenie wpływu obecności grupy metoksylowej w pozycji C8 na regioselektywność procesu glikozylacji prowadzonego przez grzyby strzępkowe

Cykl publikacji osiągnięcia naukowego uzupełniono o:

11) przegląd najważniejszych flawonoidów piwa o aktywności pro- i estrogennej, uwzględniając ich powstawanie, metabolizm oraz aktywność biologiczną

Badania opisane w trzech, spośród publikacji ujętych w osiągnięciu naukowym (P1, P3, P5) finansowane były z projektu SONATA 9, którego byłem *KIEROWNIKIEM* i *WYKONAWCĄ* (Zał. 3., II, 9.5).

W ramach realizacji badań ujętych w osiągnięciu naukowym uzyskano cztery patenty RP, oraz zgłoszono do ochrony kolejnych pięć innowacyjnych rozwiązań.

Podsumowując, cykl publikacji wchodzących w skład osiągnięcia, dotyczy opracowania nowych metod pozyskiwania cennych, aktywnych biologicznie związków należących do grupy flawonoidów. Modyfikacje ich struktury na drodze biotechnologicznej poprzez mikrobiologiczne transformacje z wykorzystaniem grzybów strzępkowych, prowadziły do nowych, często aktywnych biologicznie pochodnych, które trudno jest otrzymać na drodze klasycznej syntezy chemicznej. Zbadanie ich aktywności biologicznej umożliwiło określenie czynników strukturalnych w cząsteczkach flawonoidów, determinujących ich wysoką aktywność biologiczną w tym przeciwnowotworową i przeciwzapalną oraz możliwości rozprowadzania w organizmie poprzez wiązanie z ich albuminą, głównym transporterem we krwi. Opracowane mikrobiologiczne metody wprowadzania dużej polarnej cząsteczki glukozy bądź 4-*O*-metyloglukozy, która zwiększa rozpuszczalność i stabilność flawonoidów w wodzie, może przyczynić się do znacznie skuteczniejszego wchłaniania flawonoidów z przewodu pokarmowego (co zostało potwierdzone na przykładzie izokwercetyny (**17**)) niż to ma miejsce w przypadku ich aglikonowych prekursorów, co wpłynąć może na zwiększenie ich potencjału terapeutycznego. Przeprowadzone po raz pierwszy biotransformacje wogoniny (**21**) z udziałem grzybów strzępkowych, prowadziły do otrzymania rzadkiej i cennej pod względem aktywności biologicznej 4'-hydroksywogoniny (**22**) oraz poszerzyły wiedzę na temat procesu mikrobiologicznych glikozylacji flawonów, w tym wpływu budowy pierścienia B na rodzaj przyłączanego cukru oraz wpływu podstawienia pierścienia A na regioselektywność tego procesu, co ułatwić może opracowanie nowych metod otrzymywania aktywnych związków o wysokim potencjale terapeutycznym.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Zagraniczny staż naukowy realizowany w Centrum Algatech, Instytut Mikrobiologii Czeskiej Akademii Nauk w Trzeboniu (Třeboň) w Republice Czeskiej (Zał. 3., II, 11.1)

W roku 2013 wygrałem otwarty konkurs na stanowisko pracownika naukowego (Post-doc) w międzynarodowym projekcie badawczym „Algain” (Zał. 3, II, 9.7.) w ramach, którego zostałem zatrudniony na okres 28 miesięcy (04.03.2015 – 30.06.2015) w Centrum Algatech (Centrum Biotechnologii Alg), w Instytucie Mikrobiologii Czeskiej Akademii Nauk (Třeboň, Republika Czeska). Projekt badawczy realizowali naukowcy z Czech, Niemiec, Wielkiej Brytanii, Hiszpanii, Węgier, Japonii, Chile i Peru. Centrum Algatech jest uznaną na świecie jednostką naukową, która zajmuje się badaniami podstawowymi oraz zastosowaniem mikroalg, cyjanobakterii oraz bakterii fotosyntetycznych w przemyśle spożywczym, paszowym oraz w medycynie i weterynarii i znane jest na świecie z wybitnych badań nad fotosyntezą i cyklem komórkowym glonów.

Zadanie badawcze pt. „*The Structure and Origin of Modified Products of the Tetrapyrrol Biosynthetic Pathway Excreted by Cyanobacteria*” którego byłem głównym wykonawcą, realizowałem pod opieką naukową profesora Josefa Komendy (prof. RNDr. CSc., DSc, h-indeks = 49 według Google Scholar). Dotyczyło ono badań nad nowymi rozpuszczalnymi w wodzie, żółtymi metabolitami wtórnymi biosyntetyzowanymi przez komórki dzikich szczepów cyjanobakterii *Synechocystis* sp. PCC 6803 oraz ich mutantów z knock-out’em genów fotosystemu II. Badania obejmowały m.in.:

- 1) określenie warunków biosyntezy metabolitów z uwzględnieniem hodowli autotroficznych i heterotroficznym.

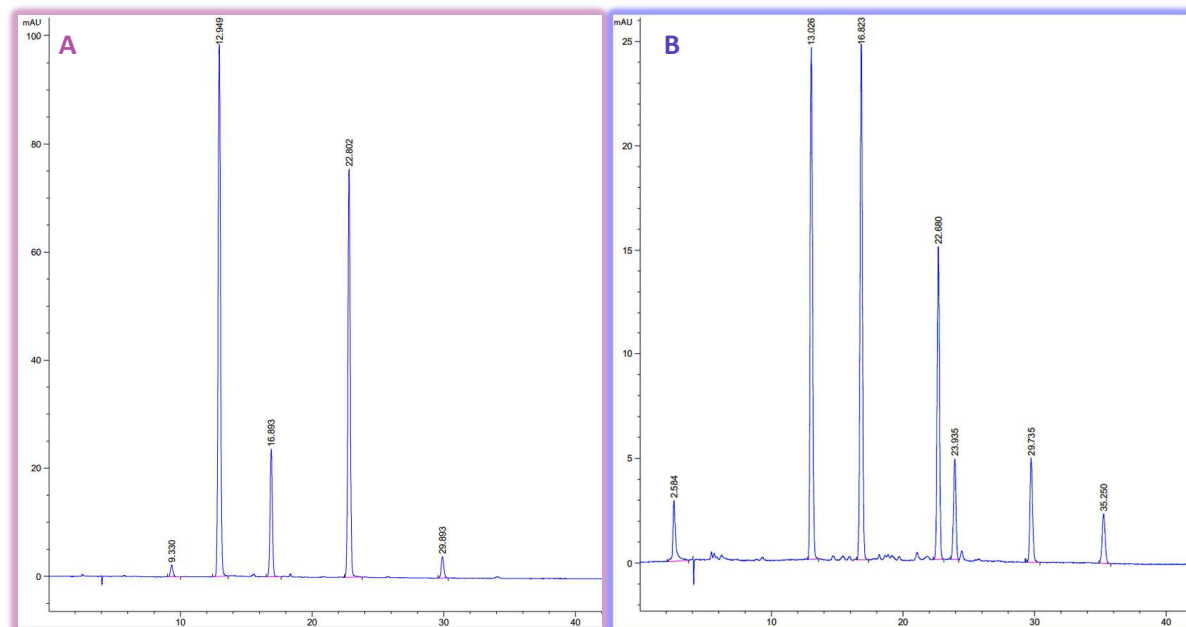
W tym celu przeprowadzono szereg badań wpływu czynników warunkujących wzrost cyjanobakterii. W hodowlach autotroficznych oraz heterotroficznych badano wpływ rodzaju oraz stężenie niezbędnych do wzrostu związków azotowych, fosforu, jonów: żelaza, boru, manganu, cynku, miedzi, molibdenu i kobaltu oraz pH podłoża z uwzględnieniem buforów organicznych i nieorganicznych. Dla hodowli autotroficznych badano dodatkowo wpływ natężenia światła oraz ilości rozpuszczonego w podłożu dwutlenku węgla, natomiast dla hodowli heterotroficznych wpływ stężenia oraz rodzaju organicznych źródeł węgla. Oprócz kontroli wydzielania żółtych metabolitów wtórnych badano również stężenie barwników fotosyntetycznych. W pierwszym etapie badań obecność wydzielanych metabolitów badano z wykorzystaniem metod spektroskopii UV-VIS.

Po określeniu optymalnych warunków hodowli do produkcji metabolitów

- 2) opracowano metody analityczne niezbędne do oznaczanie nowych metabolitów.

W tym celu przeprowadzono kompleksowe badania z wykorzystaniem metod wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) sprzężonej z detektorem UV-VIS, fluorescencyjnym (FLD) oraz ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC) sprzężonej z wysokorozdzielczym detektorem spektrometrii mas (HR-ESI-qTOF-MS/MS). Przetestowano szereg metod chromatografii w układzie faz odwróconych (kolumny C18, C8 w tym umożliwiające prace przy 100% stężeniu wody i pH < 2) oraz chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC) stosując jako eluenty układy zawierające wodę,

bufory, metanol i acetonitryl oraz kwasy organiczne (mrówkowy, octowy i trifluoroctowy) oraz zasady. Opracowane metody pozwoliły na wstępną analizę metabolitów wytwarzanych przez szczepy dzikie oraz ich mutanty. Przykładowe chromatogramy HILIC HPLC z hodowli przedstawiono na rysunku 14.



Rysunek 14. Przykładowe chromatogramy HILIC HPLC-UV-VIS hodowli A: szczepu dzikiego *Synechocystis* sp. PCC 6803 (WT NIX) oraz B: mutanta *Synechocystis* Tol145 ($\Delta D2$), detekcja przy $\lambda = 415$ nm.

Kolejnym etapem było:

- 3) opracowanie metod oczyszczania badanych metabolitów wtórnych.

Ponieważ badane żółte metabolity wykazały wysoką rozpuszczalność w wodzie w dużym zakresie pH, metody ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi w układzie ciecz-ciecz okazały się nieskuteczne. Po zakończeniu hodowli i odwirowaniu biomasy konieczne było żmudne zatężanie płynu pochodzącego z wykorzystaniem wyparek próżniowych. Następnie w celu odseparowania badanych metabolitów od innych, rozpuszczalnych w wodzie związków wytwarzanych przez cyjanobakterie (w tym m.in. cukrów zewnątrzkomórkowych) oraz składników podłoża, opracowano metody precypitacji z wykorzystaniem antyrozpuszczalników, polegające na selektywnym strącaniu frakcji składników płynu pochodzącego za pomocą dodatku rozpuszczalników organicznych o różnej polarności w różnej temperaturze. W tym celu wykorzystano: 2-propanol, aceton, acetonitryl oraz niemieszające się swobodnie z wodą 2-butanol, octan etylu, chlorek metylenu oraz chloroform. Metody te umożliwiły usunięcie znacznych ilości produktów ubocznych oraz otrzymanie frakcji wzbogaconych w badane metabolity, co umożliwiło ich dalszy rozdział.

W tym celu opracowano:

- 4) metody oczyszczania przy użyciu chromatografii kolumnowej z wykorzystaniem ziemi krzemkowej (Celite) oraz żelu krzemionkowego (Silica 60) jako wypełnienia.

Otrzymane w ten sposób związki badano strukturalnie z wykorzystaniem metod magnetycznego rezonansu jądrowego 1D NMR: ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{13}C NMR (DEPT 135°), ^{15}N NMR, ^{31}P NMR oraz 2D

NMR: ^1H - ^1H NMR (COSY), ^1H - ^1H NMR (NOESY), ^1H - ^{13}C NMR (HSQC), ^1H - ^{13}C NMR (HMBC) oraz spektrometrii mas (HR-ESI-qTOF-MS/MS).

Zagraniczny staż naukowy realizowany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Waszyngtońskiego w Saint Louis w Stanach Zjednoczonych (Załącznik 3., II, 11.2)

W ramach realizacji zadania badawczego pt. „*The Structure and Origin of Modified Products of the Tetrapyrrol Biosynthetic Pathway Excreted by Cyanobacteria*” w międzynarodowym projekcie badawczym „Algain” (Załącznik 3, II, 9.7.) prowadziłem również badania na Wydziale Biologii Uniwersytetu Waszyngtońskiego w Saint Louis w Stanach Zjednoczonych pod opieką naukową profesora Roberta E. Blankenshipa (Lucille P. Markey Distinguished Professor of Arts and Sciences, h-indeks = 86, według Google Scholar), które dotyczyły interakcji pomiędzy białkami kompleksu enzymatycznego związanego ostatnimi etapami szlaku syntetycznego chlorofilu w komórkach cyjanobakterii *Synechocystis* sp. PCC 6803 z wykorzystaniem sieciowania (cross-linking) oraz wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HR-MS) oraz badania oddziaływań pomiędzy barwnikami fotosyntetycznymi, karotenoidami i chlorofilem związanym w kompleksie białkowym syntazy chlorofilu, z zastosowaniem technik ultraszybkiej czasowo-rozdzielczej spektroskopii absorpcyjnej. W tym celu nawiązałem współpracę z profesorem Haijun Liu (Research Assistant Professor, h-indeks = 24 według Google Scholar) oraz doktorem Dariuszem Niedźwiedzkiem (h-indeks = 37 według Google Scholar). W ramach wspólnie realizowanego projektu badano interakcje między czterema białkami wchodzącymi w skład kompleksu syntazy chlorofilu (ChlG-HliD-Ycf39-YidC) enzymu odpowiedzialnego za terminalny etap syntezy chlorofilu, przyłączanie fitolu do fragmentu porfiryнового chlorofilu, składającego się z białek: syntazy chlorofilu - ChlG, białka indukowanego silnym światłem, (ang. High Light-inducible Polypeptides- Hlip) wiążącego m.in. karotenoidy - HliD, białka biorącego udział w składaniu fotosystemu II u cyjanobakterii - Ycf39 oraz białka YidC biorącego udział w prawidłowym fałdowaniu białek błonowych i we wstawianiu ich w wewnętrzną błonę bakterii. W tym celu stworzono mutant cyjanobakterii *Synechocystis* (Flag-chlG/ Δ chlG), u którego zastąpiono natywnie występujące białko syntazy chlorofilu (ChlG), na białko syntazy chlorofilu zawierające dodatkowy krótki fragment peptydowy bogaty w kwas asparaginowy (3xFlag-tag), umożliwiając jego łatwe oczyszczanie za pomocą chromatografii powinowactwa wykorzystując wypełnienie z przeciwciałem na Anty-Flag (Anti-DYKDDDDK). Po ekspresji klonowanego białka i potwierdzeniu jego funkcjonalności (prawidłowa biosynteza chlorofilu u mutantu) wyizolowany i oczyszczony kompleks syntazy chlorofilu posłużył do badań interakcji oraz struktury kompleksu. W tym celu opracowano metodę sieciowania białek kompleksu polegającą na doborze odpowiednich „linkerów”, a w następnym etapie ich optymalnego stężenia do reakcji sieciowania. Oczyszczone elektroforetycznie białko po reakcji sieciowania (analizy Top-Down) oraz po sieciowaniu i trawieniu proteazami (analizy Bottom-Up) badano następnie metodami wysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC) sprzężonej z detektorami wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HR-MS) z wykorzystaniem MALDI i ESI jako metody jonizacji. W celu określenia budowy kompleksu syntazy chlorofilu konieczne było modelowanie molekularne białek, nie posiadających zdeponowanej struktury krystalograficznej, w oparciu o ich sekwencje nukleotydowe. W tym celu posłużono się narzędziem przewidywania i modelowania struktury białek I-TASSER (University of Michigan).

Przeprowadzone badania sieciowania oraz spektrometrii mas umożliwiło częściowe określenie pozycji poszczególnych składowych białek kompleksu oraz ich orientacji w błonie komórkowej.

Drugim projektem realizowanym w ramach współpracy z Uniwersytetem Waszyngtońskim w Saint Louis było badanie roli białek indukowanych silnym światłem - Hlip (HliD i HliC) oraz związanych z nimi strukturze karotenoidów – β -karotenu, zeaksantyny oraz myksoksantofilu na wygaszanie stanu wzbudzenia cząsteczek chlorofilu związanych w kompleksie syntazy chlorofilu – ChlG. Obecność karotenoidów w kompleksie syntazy chlorofilu związane jest z fotoprotekcją. W warunkach silnego oświetlenia karotenoidy wygaszają singletowe stany wzbudzone chlorofilu a, aby zapobiec tworzeniu ich stanów tripletowych, które mogą stać się sensybilizatorami promującymi tworzenie silnie reaktywnego i utleniającego tlenu singletowego. Karotenoidy, jako akceptory energii wygaszają niebezpieczne, trypletowe stany chlorofilu oraz zmiatają tlen singletowy, po czym same się wygaszają¹¹⁴⁻¹¹⁶. Badania przeprowadzone na kompleksie syntazy chlorofilu wyizolowanym z mutantów cyjanobakterii *Synechocystis*, z zastosowaniem technik ultraszybką czasowo-rozdzielczą spektroskopii absorpcyjnej w temperaturze pokojowej oraz kriogenicznej, umożliwiły określenie funkcji i mechanizmu działania karotenoidów związanych z białkami Hlip w kompleksie. Dowiedziono, że białka Hlip działają jako konserwatywny moduł funkcjonalny, który zapobiega fotouszkodzeniu zarówno kompleksów białkowych podczas biosyntezy chlorofilu jak również podczas składania samego fotosystemu II.

Realizacja zadania badawczego pt. *“The Structure and Origin of Modified Products of the Tetrapyrrol Biosynthetic Pathway Excreted by Cyanobacteria”* w ramach projektu *“Algain”* zaowocowała trzema doniesieniami naukowymi:

- 1) Niedzwiedzki, D. M., **Tronina, T.**, Liu, H., Staleva, H., Komenda, J., Sobotka, R., Blankenship R. E., Polivka T. (2016). Carotenoid-induced non-photochemical quenching in the cyanobacterial chlorophyll synthase–HliC/D complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(9), 1430-1439. (IF_{JCR} = 4,932; MEiN = 40 pkt.) (*Zał. 3, II, 4.14.*)
- 2) **Tronina T.**, Sobotka R., Komenda J.: Specific growth conditions elicit secretion of unusual yellowish-brown pigments in the TOL145 strain of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. 54th workshop conference of the Czech Phycological Society, Trebon, Czechy, 2013. (*Zał. 3, II, 7.1.20*)
- 3) Niedzwiedzki D.M., **Tronina T.**, Liu H., Staleva H., Komenda J., Sobotka R., E. Blankenship R.E., Polivka T. „Carotenoid-induced Non-photochemical Quenching in Chlorophyll-Carotenoid Protein from Cyanobacteria”. All Hands 2016, 6th Annual Meeting at Washington University in St. Louis. Saint Louis, 2016 Stany Zjednoczone (*Zał. 3, II, 7.1.40*)

Wiedza zdobyta w Centrum Algatech w Czechach oraz na Uniwersytecie Waszyngtońskim w Saint Louis w Stanach Zjednoczonych dotycząca składania kompleksów białkowych fotosystemów oraz ich oznaczania za pomocą technik sieciowania chemicznego oraz wysokorozdzielczej spektrometrii mas stanowiła przyczynek do stworzenia wykładów będących częścią obligatoryjnego bloku przedmiotu Biotransformacje dla studentów II stopnia kierunku biotechnologia, specjalizacji Biotransformacje.

Potwierdzenie odbycia opisanych stażów naukowych znajdują się w załączniku 7.

Wykaz cytowanej literatury:

1. Dias, M. C.; Pinto, D. C.; Silva, A. M., Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules* **2021**, *26* (17), 5377.
2. Di Ferdinando, M.; Brunetti, C.; Fini, A.; Tattini, M., Flavonoids as antioxidants in plants under abiotic stresses. *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability* **2012**, 159-179.
3. Panche, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R., Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science* **2016**, *5*, e47.
4. Dias, M. C.; Pinto, D. C.; Freitas, H.; Santos, C.; Silva, A. M., The antioxidant system in *Olea europaea* to enhanced UV-B radiation also depends on flavonoids and secoiridoids. *Phytochemistry* **2020**, *170*, 112199.
5. Roy, A.; Khan, A.; Ahmad, I.; Alghamdi, S.; Rajab, B. S.; Babalghith, A. O.; Alshahrani, M. Y.; Islam, S.; Islam, M. R., Flavonoids a bioactive compound from medicinal plants and its therapeutic applications. *BioMed Research International* **2022**, *2022*.
6. Ullah, A.; Munir, S.; Badshah, S. L.; Khan, N.; Ghani, L.; Poulson, B. G.; Emwas, A.-H.; Jaremko, M., Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules* **2020**, *25* (22), 5243.
7. Guven, H.; Arici, A.; Simsek, O., Flavonoids in our foods: a short review. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences* **2019**, *3* (2), 96-106.
8. Grotewold, E., *The Science of Flavonoids*. Springer Science & Business Media: 2008.
9. Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry* **2002**, *13* (10), 572-584.
10. Kumar, S.; Pandey, A. K., Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The scientific world journal* **2013**, *2013*.
11. Jucá, M. M.; Cysne Filho, F. M. S.; de Almeida, J. C.; Mesquita, D. d. S.; Barriga, J. R. d. M.; Dias, K. C. F.; Barbosa, T. M.; Vasconcelos, L. C.; Leal, L. K. A. M.; Ribeiro, J. E., Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Natural product research* **2020**, *34* (5), 692-705.
12. Tzanova, M.; Atanasov, V.; Yaneva, Z.; Ivanova, D.; Dinev, T., Selectivity of current extraction techniques for flavonoids from plant materials. *Processes* **2020**, *8* (10), 1222.
13. Pereira, A. M.; Cidade, H.; Tiritan, M. E., Stereoselective Synthesis of Flavonoids: A Brief Overview. *Molecules* **2023**, *28* (1), 426.
14. Wang, A.; Zhang, F.; Huang, L.; Yin, X.; Li, H.; Wang, Q.; Zeng, Z.; Xie, T., New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids. *J Med Plants Res* **2010**, *4* (10), 847-856.
15. Khodzhaieva, R. S.; Gladkov, E. S.; Kyrychenko, A.; Roshal, A. D., Progress and achievements in glycosylation of flavonoids. *Frontiers in Chemistry* **2021**, *9*, 637994.
16. Qin, D.; Dong, J., Multi-Level Optimization and Strategies in Microbial Biotransformation of Nature Products. *Molecules* **2023**, *28* (6), 2619.
17. Kubeš, J., Geography of world Hop production 1990–2019. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2022**, *80* (1), 84-91.
18. Almaguer, C.; Schönberger, C.; Gastl, M.; Arendt, E. K.; Becker, T., *Humulus lupulus*—a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing* **2014**, *120* (4), 289-314.
19. Stevens, J. F.; Page, J. E., Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* **2004**, *65* (10), 1317-1330.
20. Gerhäuser, C., Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Molecular Nutrition & Food Research* **2005**, *49* (9), 827-831.
21. Liu, M.; Hansen, P.; Wang, G.; Qiu, L.; Dong, J.; Yin, H.; Qian, Z.; Yang, M.; Miao, J., Pharmacological Profile of Xanthohumol, a Prenylated Flavonoid from Hops (*Humulus lupulus*). *Molecules* **2015**, *20* (1), 754.

22. Miyata, S.; Inoue, J.; Shimizu, M.; Sato, R., Xanthohumol improves diet-induced obesity and fatty liver by suppressing sterol regulatory element-binding protein (SREBP) activation. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290* (33), 20565-20579.
23. Jiang, C.-H.; Sun, T.-L.; Xiang, D.-X.; Wei, S.-S.; Li, W.-Q., Anticancer activity and mechanism of xanthohumol: a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus* L.). *Frontiers in pharmacology* **2018**, *9*, 530.
24. Girisa, S.; Saikia, Q.; Bordoloi, D.; Banik, K.; Monisha, J.; Daimary, U. D.; Verma, E.; Ahn, K. S.; Kunnumakkara, A. B., Xanthohumol from Hop: Hope for cancer prevention and treatment. *IUBMB life* **2021**, *73* (8), 1016-1044.
25. Harish, V.; Haque, E.; Śmiech, M.; Taniguchi, H.; Jamieson, S.; Tewari, D.; Bishayee, A., Xanthohumol for human malignancies: Chemistry, pharmacokinetics and molecular targets. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (9), 4478.
26. Tuli, H. S.; Aggarwal, V.; Parashar, G.; Aggarwal, D.; Parashar, N. C.; Tuorkey, M. J.; Varol, M.; Sak, K.; Kumar, M.; Buttar, H. S., Xanthohumol: a metabolite with promising anti-neoplastic potential. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* **2022**, *22* (3), 418-432.
27. Vesaghhamedani, S.; Ebrahimzadeh, F.; Najafi, E.; Shabgah, O. G.; Askari, E.; Shabgah, A. G.; Mohammadi, H.; Jadidi-Niaragh, F.; Navashenaq, J. G., Xanthohumol: An underestimated, while potent and promising chemotherapeutic agent in cancer treatment. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **2022**, *172*, 3-14.
28. Chen, X.; Mukwaya, E.; Wong, M.-S.; Zhang, Y., A systematic review on biological activities of prenylated flavonoids. *Pharmaceutical biology* **2014**, *52* (5), 655-660.
29. Nguyen, V. S.; Dong, L. P.; Wang, S. C.; Wang, Q., The first total synthesis of sophoflavescenol, flavenochromane C, and citrusinol. *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, *2015* (10), 2297-2302.
30. Shi, S.; Li, J.; Zhao, X.; Liu, Q.; Song, S.-J., A comprehensive review: Biological activity, modification and synthetic methodologies of prenylated flavonoids. *Phytochemistry* **2021**, *191*, 112895.
31. Tronina, T.; Bartmańska, A.; Popłoński, J.; Huszcza, E., Transformation of xanthohumol by *Aspergillus ochraceus*. *Journal of Basic Microbiology* **2014**, *54* (1), 66-71.
32. Tronina, T.; Bartmańska, A.; Filip-Psurska, B.; Wietrzyk, J.; Popłoński, J.; Huszcza, E., Fungal metabolites of xanthohumol with potent antiproliferative activity on human cancer cell lines in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21* (7), 2001-2006.
33. Bartmańska, A.; Tronina, T.; Popłoński, J.; Milczarek, M.; Filip-Psurska, B.; Wietrzyk, J., Highly cancer selective antiproliferative activity of natural prenylated flavonoids. *Molecules* **2018**, *23* (11), 2922.
34. Stompor, M.; Potaniec, B.; Szumny, A.; Zieliński, P.; Żołnierczyk, A.; Anioł, M., Mikrobiologiczna redukcja ksantohumolu i 4-metoksychalkonu. *Przemysł Chemiczny* **2013**, *92*, 574-578.
35. Popłoński, J.; Sordon, S.; Tronina, T.; Huszcza, E., Selektywne uwodornienie ksantohumolu do α , β -dihydroksantohumolu. *Przemysł Chemiczny* **2014**, *93*, 1916-1918.
36. Boucherle, B.; Peuchmaur, M.; Boumendjel, A.; Haudecoeur, R., Occurrences, biosynthesis and properties of auronones as high-end evolutionary products. *Phytochemistry* **2017**, *142*, 92-111.
37. Wen, J.; Liu, B.; Yuan, E.; Ma, Y.; Zhu, Y., Preparation and physicochemical properties of the complex of naringenin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Molecules* **2010**, *15* (6), 4401-4407.
38. Pulley, G. N., Solubility of naringin in water. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* **1936**, *8* (5), 360-360.
39. Saija, A.; Tomaino, A.; Trombetta, D.; Luisa Pellegrino, M.; Tita, B.; Messina, C.; Bonina, F. P.; Rocco, C.; Nicolosi, G.; Castelli, F., 'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and

- interaction with model membranes of three new quercetin esters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2003**, *56* (2), 167-174.
40. Reinboth, M.; Wolffram, S.; Abraham, G.; Ungemach, F. R.; Cermak, R., Oral bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides in dogs. *British Journal of Nutrition* **2010**, *104* (2), 198-203.
41. Nowak, B.; Poźniak, B.; Popłoński, J.; Bobak, Ł.; Matuszewska, A.; Kwiatkowska, J.; Dziewiszek, W.; Huszcza, E.; Szeląg, A., Pharmacokinetics of xanthohumol in rats of both sexes after oral and intravenous administration of pure xanthohumol and prenylflavonoid extract. *Advances in Clinical & Experimental Medicine* **2020**, *29* (9).
42. Lairson, L.; Henrissat, B.; Davies, G.; Withers, S., Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 521-555.
43. Xie, L.; Zhang, L.; Wang, C.; Wang, X.; Xu, Y.-m.; Yu, H.; Wu, P.; Li, S.; Han, L.; Gunatilaka, A. L., Methylglucosylation of aromatic amino and phenolic moieties of drug-like biosynthons by combinatorial biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2018**, *115* (22), E4980-E4989.
44. Xie, L.; Zhang, L.; Bai, J.; Yue, Q.; Zhang, M.; Li, J.; Wang, C.; Xu, Y., Methylglucosylation of phenolic compounds by fungal glycosyltransferase-methyltransferase functional modules. *Journal of agricultural and food chemistry* **2019**, *67* (31), 8573-8580.
45. Huszcza, E.; Bartmańska, A.; Tronina, T., Glycosylation of xanthohumol by fungi. *Zeitschrift für Naturforschung C* **2008**, *63* (7-8), 557-560.
46. Tronina, T.; Bartmańska, A.; Milczarek, M.; Wietrzyk, J.; Popłoński, J.; Rój, E.; Huszcza, E., Antioxidant and antiproliferative activity of glycosides obtained by biotransformation of xanthohumol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23* (7), 1957-1960.
47. Nowakowska, Z., A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *42* (2), 125-137.
48. Kontogiorgis, C.; Mantzanidou, M.; Hadjipavlou-Litina, D., Chalcones and their potential role in inflammation. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2008**, *8* (12), 1224-1242.
49. Bandgar, B. P.; Gawande, S. S.; Bodade, R. G.; Totre, J. V.; Khobragade, C. N., Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18* (3), 1364-1370.
50. Gerhäuser, C.; Alt, A.; Heiss, E.; Gamal-Eldeen, A.; Klimo, K.; Knauff, J.; Neumann, I.; Scherf, H.-R.; Frank, N.; Bartsch, H.; Becker, H., Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Molecular Cancer Therapeutics* **2002**, *1* (11), 959-969.
51. Arques, S. In *Serum albumin and cardiovascular disease: State-of-the-art review*, Annales de Cardiologie et d'Angéiologie, Elsevier: 2020; pp 192-200.
52. Belinskaia, D. A.; Voronina, P. A.; Shmurak, V. I.; Jenkins, R. O.; Goncharov, N. V., Serum albumin in health and disease: esterase, antioxidant, transporting and signaling properties. *International journal of molecular sciences* **2021**, *22* (19), 10318.
53. Pokrivčák, J.; Supeková, S. C.; Lančarič, D.; Savov, R.; Tóth, M.; Vašina, R., Development of beer industry and craft beer expansion. *Journal of Food & Nutrition Research* **2019**, *58* (1).
54. Pohjanvirta, R.; Nasri, A., The potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin: a friend or a foe? *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23* (6), 3168.
55. Guo, J.; Nikolic, D.; Chadwick, L. R.; Pauli, G. F.; van Breemen, R. B., Identification of human hepatic cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of 8-prenylnaringenin and isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) *Drug Metabolism and Disposition* **2006**, *34* (7), 1152-1159.
56. Bartmańska, A.; Walecka-Zacharska, E.; Tronina, T.; Popłoński, J.; Sordon, S.; Brzezowska, E.; Bania, J.; Huszcza, E., Antimicrobial properties of spent hops extracts, flavonoids isolated therefrom, and their derivatives. *Molecules* **2018**, *23* (8), 2059.

57. Kováčová, J.; Lehotay, J.; Úrgeová, E.; Mocak, J.; Čížmárik, J., Determination of selected flavonoids in hop extract by HPLC. *Journal of liquid chromatography & related technologies* **2011**, *34* (5), 329-340.
58. Deepika; Maurya, P. K., Health benefits of quercetin in age-related diseases. *Molecules* **2022**, *27* (8), 2498.
59. Mbikay, M.; Chrétien, M., Isoquercetin as an anti-COVID-19 medication: A potential to realize. *Frontiers in Pharmacology* **2022**, *13*, 830205.
60. Zou, H.; Ye, H.; Kamaraj, R.; Zhang, T.; Zhang, J.; Pavek, P., A review on pharmacological activities and synergistic effect of quercetin with small molecule agents. *Phytomedicine* **2021**, *92*, 153736.
61. Suzuki, Y.; Suzuki, K.; Yoneyama, M.; Miyake, T., 4^G-alpha-D-glucopyranosyl Rutin, and its Preparation and Uses. Google Patents: 1991.
62. Lee, C. W.; Seo, J. Y.; Lee, J.; Choi, J. W.; Cho, S.; Bae, J. Y.; Sohng, J. K.; Kim, S. O.; Kim, J.; Park, Y. I., 3-O-Glucosylation of quercetin enhances inhibitory effects on the adipocyte differentiation and lipogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2017**, *95*, 589-598.
63. Morand, C.; Manach, C.; Crespy, V.; Remesy, C., Quercetin 3-O-β-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radical Research* **2000**, *33* (5), 667-676.
64. Stopa, J. D.; Neuberger, D.; Puligandla, M.; Furie, B.; Flaumenhaft, R.; Zwicker, J. I., Protein disulfide isomerase inhibition blocks thrombin generation in humans by interfering with platelet factor V activation. *JCI insight* **2017**, *2* (1).
65. Day, A. J.; DuPont, M. S.; Ridley, S.; Rhodes, M.; Rhodes, M. J.; Morgan, M. R.; Williamson, G., Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β-glucosidase activity. *FEBS letters* **1998**, *436* (1), 71-75.
66. Strugała, P.; Tronina, T.; Huszcza, E.; Gabrielska, J., Bioactivity in vitro of quercetin glycoside obtained in beauveria bassiana culture and its interaction with liposome membranes. *Molecules* **2017**, *22* (9), 1520.
67. Dymarska, M.; Janeczko, T.; Kostrzewa-Susłow, E., Glycosylation of 3-hydroxyflavone, 3-methoxyflavone, quercetin and baicalein in fungal cultures of the genus *Isaria*. *Molecules* **2018**, *23* (10), 2477.
68. Kim, S. H.; Yun, C.; Kwon, D.; Lee, Y.-H.; Kwak, J.-H.; Jung, Y.-S., Effect of Isoquercitrin on Free Fatty Acid-Induced Lipid Accumulation in HepG2 Cells. *Molecules* **2023**, *28* (3), 1476.
69. Kim, Y.; Narayanan, S.; Chang, K.-O., Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. *Antiviral research* **2010**, *88* (2), 227-235.
70. Ibrahim, A. K.; Youssef, A. I.; Arafa, A. S.; Ahmed, S. A., Anti-H5N1 virus flavonoids from *Capparis sinaica* Veill. *Natural product research* **2013**, *27* (22), 2149-2153.
71. Wong, G.; He, S.; Siragam, V.; Bi, Y.; Mbikay, M.; Chretien, M.; Qiu, X., Antiviral activity of quercetin-3-β-OD-glucoside against Zika virus infection. *Virologica Sinica* **2017**, *32*, 545-547.
72. De Sousa, L. R. F.; Wu, H.; Nebo, L.; Fernandes, J. B.; Kiefer, W.; Kanitz, M.; Bodem, J.; Diederich, W. E.; Schirmeister, T.; Vieira, P. C., Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: Inhibition kinetics and docking studies. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2015**, *23* (3), 466-470.
73. Qiu, X.; Kroeker, A.; He, S.; Kozak, R.; Audet, J.; Mbikay, M.; Chrétien, M., Prophylactic efficacy of quercetin 3-β-O-D-glucoside against Ebola virus infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2016**, *60* (9), 5182-5188.
74. Chen, X.; Wang, Z.; Yang, Z.; Wang, J.; Xu, Y.; Tan, R.-x.; Li, E., *Houttuynia cordata* blocks HSV infection through inhibition of NF-κB activation. *Antiviral research* **2011**, *92* (2), 341-345.
75. Kim, C. H.; Kim, J.-E.; Song, Y.-J., Antiviral activities of quercetin and isoquercitrin against human herpesviruses. *Molecules* **2020**, *25* (10), 2379.

76. Olthof, M. R.; Hollman, P. C.; Vree, T. B.; Katan, M. B., Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *The Journal of nutrition* **2000**, *130* (5), 1200-1203.
77. Wolfram, S.; Block, M.; Ader, P., Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *The Journal of nutrition* **2002**, *132* (4), 630-635.
78. Walgren, R. A.; Lin, J.-T.; Kinne, R. K.-H.; Walle, T., Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'- β -glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2000**, *294* (3), 837-843.
79. Day, A. J.; Gee, J. M.; DuPont, M. S.; Johnson, I. T.; Williamson, G., Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical pharmacology* **2003**, *65* (7), 1199-1206.
80. Sim, G.-S.; Lee, B.-C.; Cho, H. S.; Lee, J. W.; Kim, J.-H.; Lee, D.-H.; Kim, J.-H.; Pyo, H.-B.; Moon, D. C.; Oh, K.-W., Structure activity relationship of antioxidative property of flavonoids and inhibitory effect on matrix metalloproteinase activity in UVA-irradiated human dermal fibroblast. *Archives of pharmacal research* **2007**, *30*, 290-298.
81. Chaillou, L. L.; Nazareno, M. A., New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54* (22), 8397-8402.
82. Kim, J.-S.; Lee, J.-H., Correlation between solid content and antioxidant activities in Umbelliferae salad plants. *Preventive Nutrition and Food Science* **2020**, *25* (1), 84.
83. Silalahi, J., Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* **2002**, *11* (1), 79-84.
84. Choi, J. H.; Kim, K. J.; Kim, S., Comparative effect of quercetin and quercetin-3-O- β -d-glucoside on fibrin polymers, blood clots, and in rodent models. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **2016**, *30* (11), 548-558.
85. Zhao, T.; Tang, H.; Xie, L.; Zheng, Y.; Ma, Z.; Sun, Q.; Li, X., *Scutellaria baicalensis* Georgi.(Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2019**, *71* (9), 1353-1369.
86. Li, B.; Fu, T.; Yan, Y.; Baylor, N. W.; Ruscetti, F. W.; Kung, H., Inhibition of HIV infection by baicalin--a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine. *Cellular & molecular biology research* **1993**, *39* (2), 119-124.
87. Li-Weber, M., New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer treatment reviews* **2009**, *35* (1), 57-68.
88. Nagai, T.; Suzuki, Y.; Tomimiri, T.; Yamada, H., Antiviral activity of plant flavonoid, 5, 7, 4'-trihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis* against influenza A (H3N2) and B viruses. *Biological and pharmaceutical bulletin* **1995**, *18* (2), 295-299.
89. Huang, R.-L.; Chen, C.-C.; Huang, H.-L.; Chang, C.-G.; Chen, C.-F.; Chang, C.; Hsieh, M.-T., Anti-hepatitis B virus effects of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*. *Planta medica* **2000**, *66* (08), 694-698.
90. Coon, J. T.; Ernst, E., Complementary and alternative therapies in the treatment of chronic hepatitis C: a systematic review. *Journal of Hepatology* **2004**, *40* (3), 491-500.
91. Li, Y.; Ooi, L. S.; Wang, H.; But, P. P.; Ooi, V. E., Antiviral activities of medicinal herbs traditionally used in southern mainland China. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* **2004**, *18* (9), 718-722.
92. Huang, Y.-F.; Bai, C.; He, F.; Xie, Y.; Zhou, H., Review on the potential action mechanisms of Chinese medicines in treating Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Pharmacological research* **2020**, *158*, 104939.

93. Tong, T.; Wu, Y.-Q.; Ni, W.-J.; Shen, A.-Z.; Liu, S., The potential insights of Traditional Chinese Medicine on treatment of COVID-19. *Chinese medicine* **2020**, *15*, 1-6.
94. Kong, Y.; Wu, H.-W.; Chen, Y.; Lai, S.; Yang, Z.-M.; Chen, J.-S., Mechanism of Tanreqing Injection on treatment of coronavirus disease 2019 based on network pharmacology and molecular docking. *Chin. Trad. Herbal Drugs* **2020**, 1785-1794.
95. Shen, F.; Fu, Z.; Wu, Y.; Li, L.; Zhao, Y.; Xia, Y.; Kuang, G., Based on Network Pharmacology and High-Throughput Molecular Docking to Study the Potential Molecular Mechanism of Active Compounds That Bind SARS-Cov-2 Specific Target Protein in Jinhua Qingan Granules to Interfere with Covid-19. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Materia-World Science and Technology*. Available at: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5699> **2020**, 20200421, 004.
96. Mao, Y.; Su, Y.; Xue, P.; Li, L.; Zhu, S., Discussion on the mechanism of Jinhua Qinggan Granule in the treatment of novel coronavirus pneumonia. *Journal of Chinese Medicinal Materials* **2020**, *43* (11), 2843-2849.
97. Makino, T.; Hishida, A.; Goda, Y.; Mizukami, H., Comparison of the major flavonoid content of *S. baicalensis*, *S. lateriflora*, and their commercial products. *Journal of Natural Medicines* **2008**, *62* (3), 294-299.
98. Wang, H.; Yu, C.; Gao, J.; Zhao, G., Effects of processing and extracting methods on active components in Radix Scutellariae by HPLC analysis. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica* **2007**, *32* (16), 1637-1640.
99. Shen, J.; Li, P.; He, C.-n.; Liu, H.-t.; Liu, Y.-z.; Sun, X.-b.; Xu, R.; Xiao, P.-g., Simultaneous determination of 15 flavonoids from different parts of *Scutellaria baicalensis* and its chemometrics analysis. *Chinese Herbal Medicines* **2019**, *11* (1), 20-27.
100. Huang, W.-H.; Chien, P.-Y.; Yang, C.-H.; Lee, A.-R., Novel synthesis of flavonoids of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Chemical and pharmaceutical bulletin* **2003**, *51* (3), 339-340.
101. Hanioka, N.; Isobe, T.; Tanaka-Kagawa, T.; Ohkawara, S., Wogonin glucuronidation in liver and intestinal microsomes of humans, monkeys, dogs, rats, and mice. *Xenobiotica* **2020**, *50* (8), 906-912.
102. Lin, Y. L.; Ou, J. C.; Chen, C. F.; Kuo, Y. H., Flavonoids from the roots of *Scutellaria luzonica* Rolfe. *Journal of the Chinese Chemical Society* **1991**, *38* (6), 619-623.
103. Yao, H.; Li, S.; Hu, J.; Chen, Y.; Huang, L.; Lin, J.; Li, G.; Lin, X., Chromatographic fingerprint and quantitative analysis of seven bioactive compounds of *Scutellaria barbata*. *Planta medica* **2011**, *77* (04), 388-393.
104. Fan, C.; Wu, L.-H.; Zhang, G.-F.; Xu, F.; Zhang, S.; Zhang, X.; Sun, L.; Yu, Y.; Zhang, Y.; Ye, R. D., 4'-Hydroxywogonin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages and acute lung injury mice. *PloS one* **2017**, *12* (8), e0181191.
105. Sun, D.; Zhang, F.; Qian, J.; Shen, W.; Fan, H.; Tan, J.; Li, L.; Xu, C.; Yang, Y.; Cheng, H., 4'-hydroxywogonin inhibits colorectal cancer angiogenesis by disrupting PI3K/AKT signaling. *Chemico-biological interactions* **2018**, *296*, 26-33.
106. Li, P.-F.; An, X.-Z.; Ma, Y.-M.; Kong, Q.-L.; Bao, B.-X.; Yu, J., Effect of 4'-Hydroxywogonin on Proliferation and Apoptosis of Human Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* **2018**, *26* (1), 65-69.
107. Nagai, T.; Suzuki, Y.; Tomimori, T.; Yamada, H., Antiviral activity of plant flavonoid, 5, 7, 4'-trihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis* against influenza A (H3N2) and B viruses. *Biological and pharmaceutical bulletin* **1995**, *18* (2), 295-299.
108. Bartmańska, A.; Huszcza, E.; Tronina, T., Transformation of isoxanthohumol by fungi. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2009**, *61* (3-4), 221-224.
109. Bartmańska, A.; Tronina, T.; Huszcza, E., Transformation of 8-prenylnaringenin by *Absidia coerulea* and *Beauveria bassiana*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2012**, *22* (20), 6451-6453.
110. Sordon, S.; Popłoński, J.; Tronina, T.; Huszcza, E., Microbial glycosylation of daidzein, genistein and biochanin A: Two new glucosides of biochanin A. *Molecules* **2017**, *22* (1), 81.

111. Łużny, M.; Tronina, T.; Kozłowska, E.; Dymarska, M.; Popłoński, J.; Łyczko, J.; Kostrzewa-Susłow, E.; Janeczko, T., Biotransformation of methoxyflavones by selected entomopathogenic filamentous fungi. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21* (17), 6121.
112. Łużny, M.; Tronina, T.; Kozłowska, E.; Kostrzewa-Susłow, E.; Janeczko, T., Biotransformation of 5, 7-Methoxyflavones by Selected Entomopathogenic Filamentous Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2021**, *69* (13), 3879-3886.
113. Sordon, S.; Popłoński, J.; Tronina, T.; Huszcza, E., Regioselective O-glycosylation of flavonoids by fungi *Beauveria bassiana*, *Absidia coerulea* and *Absidia glauca*. *Bioorganic chemistry* **2019**, *93*, 102750.
114. Duffy, C. D.; Ruban, A. V., Dissipative pathways in the photosystem-II antenna in plants. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2015**, *152*, 215-226.
115. Krieger-Liszkay, A., Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of experimental botany* **2005**, *56* (411), 337-346.
116. Triantaphylidès, C.; Havaux, M., Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in plant science* **2009**, *14* (4), 219-228.
117. Naftali, T.; Mechulam, R.; Marii, A.; Gabay, G.; Stein, A.; Bronshtain, M.; Laish, I.; Benjaminov, F.; Konikoff, F. M., Low-dose cannabidiol is safe but not effective in the treatment for Crohn's disease, a randomized controlled trial. *Digestive diseases and sciences* **2017**, *62*, 1615-1620.
118. Chagas, M. H. N.; Zuardi, A. W.; Tumas, V.; Pena-Pereira, M. A.; Sobreira, E. T.; Bergamaschi, M. M.; dos Santos, A. C.; Teixeira, A. L.; Hallak, J. E.; Crippa, J. A. S., Effects of cannabidiol in the treatment of patients with Parkinson's disease: an exploratory double-blind trial. *Journal of Psychopharmacology* **2014**, *28* (11), 1088-1098.
119. Peng, J.; Fan, M.; An, C.; Ni, F.; Huang, W.; Luo, J., A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **2022**, *130* (4), 439-456.
120. Crippa, J. A. S.; Derenusson, G. N.; Ferrari, T. B.; Wichert-Ana, L.; Duran, F. L.; Martin-Santos, R.; Simões, M. V.; Bhattacharyya, S.; Fusar-Poli, P.; Atakan, Z., Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a preliminary report. *Journal of psychopharmacology* **2011**, *25* (1), 121-130.
121. Leweke, F.; Piomelli, D.; Pahlisch, F.; Muhl, D.; Gerth, C.; Hoyer, C.; Klosterkötter, J.; Hellmich, M.; Koethe, D., Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Translational psychiatry* **2012**, *2* (3), e94-e94.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

Koordinator przedmiotów (opracowanie treści programowych, sposobu realizacji wszystkich form zajęć i oceny efektów uczenia):

Jestem autorem i współautorem programów kursów realizowanych dla studentów Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności w tym:

- Chemia ogólna i nieorganicznej – dla studentów kierunku Dietetyka, studia stacjonarne I stopnia w latach 2015/2017
- Chemia ogólna - dla studentów kierunku Żywnienie Człowieka i Dietetyka, studia stacjonarne I stopnia od roku 2017/2018
- Basics of biotransformations – dla studentów kierunku Biotechnologia, studia stacjonarne I stopnia (zajęcia prowadzone w języku angielskim do wyboru zamiast języka polskiego) oraz dla studentów programu Erasmus od 2016/2017

Prowadzący lub współprowadzący:

- Enzymology – zajęcia prowadzone w języku angielskim dla studentów Uniwersytetu Południowoczeskiego w Czeskich Budziejowicach dla studentów międzynarodowego kierunku Biological Chemistry, studia stacjonarne II stopnia, zajęcia prowadzone w ramach realizacji międzynarodowego projektu naukowego „Algain” (Zał. 3, II, 9.7), 2013/2014
- Chemia – dla studentów kierunku Odnawialne źródła energii i gospodarka odpadami, studia stacjonarne I stopnia, 2015/2016
- Chemia ogólna i nieorganiczna – dla studentów kierunku Zarządzanie jakością i analiza żywności, studia stacjonarne I stopnia, 2015/2016 oraz studentów kierunku Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka, studia stacjonarne I stopnia, 2017/2021
- Modyfikacje struktur związków organicznych – dla studentów kierunku Biotechnologia, studia stacjonarne II stopnia, 2015/2021
- Biochemia – dla studentów kierunku Zootechnika, studia stacjonarne I stopnia, 2015/2019 oraz 2022/2023 oraz Bioinformatyka, studia stacjonarne I stopnia, 2018/2019 oraz 2022/2023
- Chemia Żywności – dla studentów kierunku Żywnienie człowieka i dietetyka, studia stacjonarne I stopnia, 2017/2018 oraz studentów kierunku Technologia i organizacja gastronomii, studia stacjonarne I stopnia, 2018/2019
- Podstawy Biotransformacji – dla studentów kierunku Biotechnologia, studia stacjonarne I stopnia, 2021/2023
- Instrumentalne metody analizy żywności – dla studentów kierunku Zarządzanie jakością i analiza żywności, studia stacjonarne I stopnia, 2022/2023 oraz studentów kierunku Biotechnologia, studia stacjonarne I stopnia, 2022/2023
- Biotransformacje – dla studentów kierunku Biotechnologia, studia stacjonarne II stopnia 2021/2023

Promotor prac inżynierskich:

- 1) Agnieszka Smandek „Analiza porównawcza chemicznych i biotechnologicznych metod otrzymywania prenylowanych flawonoidów chmielowych”, Data egzaminu dyplomowego: 07.02.2017
- 2) Maja Morawska „Opracowanie warunków rozdziału chmielowych związków bioaktywnych przy użyciu chromatografu Flash”, Data egzaminu dyplomowego: 05.02.2018
- 3) Patryk Kupaj „Opracowanie warunków rozdziału bioaktywnych związków tarczycy bajkalskiej przy użyciu chromatografu Flash”, Data egzaminu dyplomowego: 01.02.2019
- 4) Weronika Pistor „Opracowanie biokatalizatora do reakcji regioselektywnej glikozylacji flawonoidów”, Data egzaminu dyplomowego: 03.02.2019

Promotor prac magisterskich:

- 1) Monika Juzak „Otrzymywanie wzorców do analizowania związków bioaktywnych z suplementów diety zawierających ekstrakty z ziół”, Data egzaminu dyplomowego: 28.06.2017
- 2) Magdalena Owczarek „Otrzymywanie naturalnych polifenoli o zwiększonej biodostępności metodami biotechnologicznymi”, Data egzaminu dyplomowego: 26.09.2018
- 3) Elżbieta Ziółkowska „Zwiększanie potencjału terapeutycznego naturalnych flawonoidów metodami biotechnologicznymi”, Data egzaminu dyplomowego: 26.09.2018
- 4) Maja Morawska „Biotransformacje bioaktywnych związków występujących w tarczycy bajkalskiej”, Data egzaminu dyplomowego: 15.07.2019
- 5) Estera Mielczarek „Mikrobiologiczne transformacje naturalnych, bioaktywnych flawonoidów o potencjale terapeutycznym”, Data egzaminu dyplomowego: 15.07.2019
- 6) Monika Mrozowska „Biotransformacje flawonoidów o potencjale terapeutycznym”, Data egzaminu dyplomowego: 28.09.2020
- 7) Olga Chachuła „Mikrobiologiczne transformacje związków biologicznie aktywnych z konopi siewnych (*Cannabis sativa*)”, Data egzaminu dyplomowego: 24.09.2021
- 8) Natalia Skowerska „Mikrobiologiczne transformacje kannabinoidów”, Data egzaminu dyplomowego: 27.09.2022

Promotor pomocniczy prac doktorskich:

- 1) Paulina Strugała (aktualnie Paulina Strugała-Danak) „Aktywne biologicznie ekstrakty z owoców i ich oddziaływanie z biomolekułami”, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Data obrony: 15.12.2017, Data nadania stopnia: 09.01.2018

Opiekun projektów badawczych w kołach naukowych

- 1) Weronika Kołodziej „Mikrobiologiczne transformacje flawonoidów” projekt realizowany na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności w Studenckim Kole Naukowym „SKN OrgChem” , 2022/2023
- 2) Daniel Łój „Mikrobiologiczne transformacje prenylowanych flawonoidów z chmielu” projekt realizowany na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności w Studenckim Kole Naukowym „SKN OrgChem”, 2022/2023

Nagrody otrzymane za działalność dydaktyczną

Nagroda III stopnia w dziedzinie dydaktycznej, w szczególności za najwyższą ocenę w ankiecie studentów Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności, w semestrze zimowym roku akademickiego 2017/2018. 15.11.2019

Osiągnięcia organizacyjne oraz popularyzujące naukę

W latach od 2015 do 2020 pełniłem funkcję opiekuna roku kierunku Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka powołanego na okres I i II cyklu kształcenia (tj. od roku akademickiego 2015/2016 do roku akademickiego 2019/2020).

Udział w pracach organów kolegialnych uczelni:

- Członek Wydziałowej Komisji do spraw bieżącej oceny nauczycieli akademickich (2017)
- Zastępca Komendanta Uczelnianej Formacji Obrony Cywilnej (UFOC) Uniwersytetu Przyrodniczego We Wrocławiu od 2016 do 2021 roku
- Członek Komisji Rekrutacyjnej projektu PROM „Międzynarodowej wymiany stypendialnej doktorantów i kadry akademickiej (PPI/PRO/20199/1/0000U/001), (2019)
- Członek rady programowej kierunku studiów Biotechnologia na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego We Wrocławiu na okres od dnia 1 września 2020 roku do dnia 31 sierpnia 2024 roku.
- Komendant Uczelnianej Formacji Obrony Cywilnej (UFOC) Uniwersytetu Przyrodniczego We Wrocławiu od 2021 roku

W ramach Festiwalu Nauki brałem czynny udział w przygotowywaniu i prowadzeniu pokazów i warsztatów „Naturalne barwniki w żywności”, w kategorii: Tajemnice żywności, Wrocław, 23.09.2008.

Opracowałem i prowadziłem warsztaty dla uczniów klas VII i VIII Szkoły podstawowej w Bukowinie Sycowskiej dotyczące naturalnych barwników występujących w roślinach, ucząc m.in. metod izolowania, ekstrakcji w układach ciecz-ciecz i ciecz-ciało stałe oraz metod oczyszczania z wykorzystaniem chromatografii cienkowsarstwowej. 21.12.2022, Bukowina Sycowska.

Byłem członkiem komitetu organizacyjnego prestiżowej konferencji międzynarodowej „The 19th FEBS Young Scientists' Forum alongside the 4th FEBS Fellows Meeting, organizowana przez FEBS (Federation of European Biochemical Societies), która odbyła się 3–6 lipca 2019 r. w Krakowie (Zał. 3, II, 8.1.1.). Brałem również czynny udział, jako zastępca przewodniczącego komitetu organizacyjnego, organizowanego przez Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, jubileuszowej, XXV Sesji Naukowej Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ „Przyszłość w żywności – żywność w przyszłości” która odbyła się 20-21 maja 2021, we Wrocławiu (Zał. 3, II, 8.2.1.).

Jestem również współautorem szeregu opracowań patentowych, które znalazły uznanie zdobywając nagrody w prestiżowych konkursach ogólnopolskich i międzynarodowych:

- Srebrny medal międzynarodowych targów 48th International Exhibition of Inventions Geneva (01.16.2021, Genewa, Szwajcaria) za „Cykl 45 wynalazków dotyczących wytwarzania bioaktywnych związków flawonoidowych uzyskanych w wyniku biotransformacji”. Autorzy: Mateusz Łużny, Ewa Kozłowska, Martyna Krzywda, Monika Dymarska, Marcelina Mazur, Sandra Sordon, **Tomasz Tronina**, Jarosław Popłoński, Edyta Kostrzewa-Susłow, Tomasz Janeczko;

- Srebrny medal w konkursie International Warsaw Invention Show – IWIS 2020 (21.11.2020, Warszawa), za cykl opracowań patentowych dotyczący uzyskiwania biologicznie aktywnych związków flawonoidowych w wyniku biotransformacji. Autorzy: Mateusz Łużny, Ewa Kozłowska, Martyna Krzywda, Monika Dymarska, Marcelina Mazur, Sandra Sordon, **Tomasz Tronina**, Jarosław Popłoński, Edyta Kostrzewa-Susłow, Tomasz Janeczko;
- Główna nagroda w X edycji Ogólnopolskiego Konkursu Student-Wynalazca (luty 2020, Kielce): Mateusz Łużny, Ewa Kozłowska, Monika Dymarska, Martyna Krzywda z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz opiekunowie naukowci: dr hab. Tomasz Janeczko, dr hab. Edyta Kostrzewa-Susłow, **dr inż. Tomasz Tronina**, dr inż. Marcelina Mazur, dr inż. Jarosław Popłoński, dr inż. Sandra Sordon – za rozwiązanie Cykl 45 wynalazków dotyczących wytwarzania bioaktywnych związków flawonoidowych w wyniku biotransformacji. Nagrodzone wynalazki dotyczyły nowych sposobów otrzymywania aktywnych biologicznie flawonoidów na drodze transformacji mikrobiologicznych. Związki przedstawiane w zgłoszeniach mogą zostać zastosowane jako substancje czynne leków, składniki produktów spożywczych i suplementów diety. Posiadają m.in. właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, antydiabetyczne, antybakteryjne, przeciwgrzybicze czy przeciwwirusowe. Oprócz swoich dobroczynnych dla zdrowia właściwości, otrzymane flawonoidy charakteryzują się słodkim smakiem, dzięki czemu istnieje możliwość stworzenia z nich niskokalorycznych, prozdrowotnych słodzików o słodkości odpowiadającym sacharozie, dedykowanych również diabetykom;

Popularyzowałem również naukę, będąc gościem zaproszonym do wygłoszenia wykładów (Załącznik 3, II, 7.2.1., 7.2.2., 7.2.3.):

- Ksantohumol – główny prenylowany flawonoid chmielu jako związek wiodący do otrzymywania leków przeciwnowotworowych”. VI Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź 10-11 maja 2018.
- Aktywność biologiczna prenylowanych flawonoidów chmielu (*Humulus lupulus* L.) oraz ich pochodnych otrzymanych na drodze biotransformacji oraz syntezy chemicznej”. OSMCh - Ogólnopolskie Studenckie Mikrosympozjum Chemików. Białystok 2017.
- Biotransformacje i biokataliza jako alternatywa dla klasycznej syntezy chemicznej, Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej PTChem 2016. Białowieża 13-17 kwietnia 2016.

Brałem udział w przygotowaniu artykułu dla „Głosu Uczelni” Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu dotyczącego chemii syntetycznej oraz projektu badawczego Horyzont 2020, SynBio4Flav, którego byłem jednym z wykonawców (Załącznik 3, II, 9.3.)

(http://www.glos.upwr.edu.pl/aktualnosci/50653/synbio4flav_przemyslowa_produkcja_flawonoidow_dzieki_biologii_syntetycznej.html)

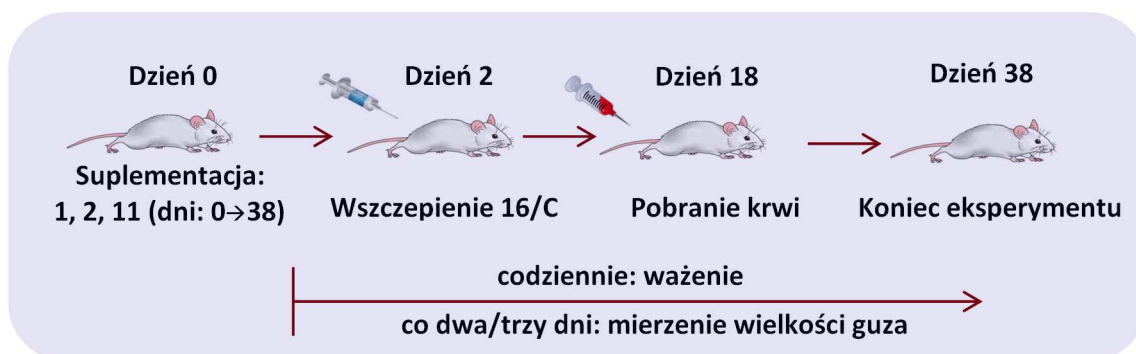
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

7.1. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych

Zainteresowania biotechnologicznymi metodami otrzymywania związków bioaktywnych, które są, jednym z moich głównych nurtów badawczych, rozpoczęło się po zakończeniu studiów inżynierskich, dlatego prace magisterską pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Ewy Huszczy realizowałem wybierając specjalizację „Biotransformacje”. Głównym celem pracy pt. „Izolowanie i biotransformacje składników wychmielin” w której opracowano metodę pozyskiwania ksantohumolu z produktu odpadowego przemysłu browarniczego – wychmielin. Uzyskano również szereg produktów na drodze biotransformacji ksantohumolu (**1**), z wykorzystaniem grzybów strzępkowych. Część wyników obronionej z wyróżnieniem pracy magisterskiej została opublikowana w *Zeitschrift für Naturforschung C* (Zał. 3., II, 4.1.). Po zakończeniu studiów II stopnia, naturalnym stało się kontynuowanie badań nad przekształceniami ksantohumolu (**1**) w ramach pracy doktorskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Ewy Huszczy. W trakcie realizacji pracy doktorskiej przeprowadzono szeroko zakrojone badania przesiewowe, w celu znalezienia najbardziej efektywnych biokatalizatorów zdolnych do modyfikacji cząsteczki ksantohumolu (**1**). Przebadano sto piętnaście mikroorganizmów należących do bakterii, drożdży oraz grzybów strzępkowych, z czego czterdzieści pięć wykazało zdolność do modyfikacji tego chalkonu **1**. Wykorzystane do dalszych badań mikroorganizmy (głównie grzyby strzępkowe) katalizowały reakcje fazy I i II metabolizmu). Wśród otrzymanych metabolitów wyizolowano i oznaczono struktury produktów będących efektem reakcji: regioselektywnej addycji cząsteczki wody do wiązania podwójnego, epoksydacji grupy prenylowej z późniejszym wytworzeniem dodatkowego pierścienia heterocyklicznego, regioselektywnego uwodornienia, enajoselektywnej cyklizacji typu chalkon – flawanon, hydroksylacji pierścienia aromatycznego, cyklizacji typu chalkon – auron, regioselektywnej reakcji sprzęgania cząsteczki glukozy lub 4-*O*-metyloglukozy. Oprócz ksantohumolu (**1**), na drodze chemicznej otrzymano, również inne analogiczne mu związki, które poddano biotransformacjom. W trakcie realizacji doktoratu wystąpiono o finansowanie projektu badawczego (grant promotorski) do Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, które uzyskano (Zał. 3., II, 9.9.). Ponadto od 01.01.2010 roku zostałem zatrudniony w Katedrze Chemii (obecnie Chemii Żywności i Biokatalizy Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu) jako asystent naukowy – **wykonawca** zadania „Synteza i biotransformacje związków flawonoidowych” w ramach realizacji międzynarodowego projektu badawczego „Biotransformacje użyteczne w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym” (Zał. 3., II, 9.8.). Realizowanie zadań badawczych w wymienionych projektach zaowocowało poszerzeniem biblioteki związków o dodatkowe pochodne ksantohumolu (**1**), produkty ich biotransformacji oraz produkty fotochemicznych reakcji ksantohumolu (**1**). Nowe związki oraz sposoby ich otrzymywania zgłoszono do ochrony patentowej. Ksantohumol (**1**) oraz jego pochodne poddano następnie badaniom biologicznym w tym: aktywności przeciwutleniającej wyrażonej jako zdolność zmiatania wolnego rodnika DPPH oraz aktywności przeciwnowotworowej *in vitro*. W celu przebadania aktywności przeciwrakowej nawiązano współpracę z zespołem prof. dr hab. Joanny Wietrzyk z

Instytutu Immunologii oraz Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, która trwa do dziś.

Badania dotyczące biotransformacji ksantohumolu (1), otrzymywania jego fotochemicznych pochodnych oraz aktywności biologicznej ksantohumolu (1) oraz jego metabolitów stały się przedmiotem czterech publikacji *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (Zał. 3., II, 4.5.), *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (Zał. 3., II, 4.6.), *Tetrahedron Letters* (Zał. 3., II, 4.7.) finansowanych w ramach projektu (Zał. 3., II, 9.8.) oraz *Journal of Basic Microbiology* (Zał. 3., II, 4.10.) finansowany ze środków projektu (Zał. 3., II, 9.9.). Spośród przebadanych związków na szczególną uwagę zasługiwał produkt regioselektywnego, mikrobiologicznego uwodornienia wiązania podwójnego ksantohumolu – α,β -dihydroksantohumol (2) przez grzyby *Fusarium tricinctum* AM16 (metodę opatentowano: Zał. 3, II, 3.1.48.), który naturalnie występuje w chmielu wyłącznie w śladowych ilościach. Posiadał on bowiem wyższą aktywność antyproliferacyjną przeciwko liniom komórkowym ludzkich nowotworów sutka (MCF-7) oraz okrężnicy (HT-29). Wyższa aktywność biologiczna względem ksantohumolu (1), śladowe ilości w chmielu (co dyskwalifikuje jego pozyskiwanie z tego źródła), zachęciło do opracowania nowych, wydajniejszych w stosunku do mikrobiologicznej, metod syntezy chemicznej tego związku, które opublikowano w branżowym czasopiśmie *Przemysł Chemiczny* (Zał. 3, II, 4.11.) oraz niektóre opatentowano (Zał. 3, II, 3.1.42.). Opracowanie efektywnej metody syntezy α,β -dihydroksantohumolu (2) z ksantohumolu (1) umożliwiła otrzymywanie tego związku w ilościach umożliwiających prowadzenie badań nad biotransformacjami oraz aktywnością biologiczną, w efekcie czego po zakończeniu doktoratu i powrocie ze staży zagranicznych, α,β -dihydroksantohumol (2), ksantohumol (1) oraz najsilniejszy znany fitoestrogen - 8-prenylonaringeninę (11) we współpracy z zespołem prof. dr hab. Joanny Wietrzyk, dr inż. Magdaleną Milczarek oraz dr inż. Beatą Filip – Psurską, poddano badaniom *in vivo* na myszach z wszczepionym estrogenozależnym nowotworem sutka (linia komórkowa 16/C) w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez Krajowy Narodowy Ośrodek Wiedzący (Konsorcjum Wrocławskie Centrum Biotechnologii), którego byłem **kierownikiem** oraz **wykonawcą** (Zał. 3., II, 9.4.). Badania miały wykazać czy podawanie prenylowanych flawonoidów chmielu (1, 2, 11) w dawkach chemoprewencyjnych (36,8 mg/kg masy ciała) może wpływać na hamowanie lub promowanie wzrostu guzów litych u 6-8 tygodniowych samic myszy C3H z wszczepionym nowotworem. Badania realizowane w ramach projektu przedstawiono na schemacie 4.



Schemat 4. Badanie wpływu ksantohumolu (1), α,β -dihydroksantohumolu (2) i 8-prenylonaringeniny (11) na rozwój estrogenozależnego nowotworu sutka 16/C u myszy C3H.

Badania przeprowadzono względem próby kontrolnej (grupa myszy, której podawano wodny roztwór dimetylosulfotlenku (DMSO), będący nietoksycznym rozpuszczalnikiem flawonoidów **1**, **2**, **11**, ale nie zawierający ich. Myszy codziennie ważono, w celu korekty masy podawanych flawonoidów, tak by zawsze wynosiła 36,8 mg/kg masy ciała, a co drugi/trzeci dzień mierzono nowotwory, żeby obliczyć ich objętości.

Po osiemnastu dniach od rozpoczęcia eksperymentu, pobrano myszom krew do badań w celu, przebadania ich ogólnego stanu zdrowia. Po 38 dniach zakończono eksperyment. W trakcie trwania badań średnie objętości guzów u myszy suplementowanych flawonoidami **1**, **2** i **11**, porównywano ze średnimi objętościami guzów z grupy kontrolnej. U wszystkich grup myszy (wraz z kontrolną), guzy nowotworowe pojawiły się w dwudziestym drugim dniu, od rozpoczęcia suplementacji flawonoidami. Od dwudziestego dziewiątego dnia zaobserwowano znaczący wzrost guzów u wszystkich badanych grup, przy czym nie wykazano różnic między kontrolą, a grupą myszy suplementowanych ksantohumolem (**1**) i α,β -dihydroksantohumolem (**2**). Znacząco różniła się wyłącznie grupa, której podawano 8-prenylonaringeninę (**11**). W końcowych dniach eksperymentu (36 i 38 dniu suplementacji) zaobserwowano, że ksantohumol (**1**) oraz α,β -dihydroksantohumol (**2**) hamowały wzrosty guzów, podczas, gdy w grupie, której podawano 8-prenylonaringeninę (**11**) objętości guzów były znacząco wyższe niż u grupy kontrolnej. Flawonoidem najsilniej hamującym rozwój raka okazał się α,β -dihydroksantohumol (**2**). Ksantohumol (**1**), mimo, iż wykazuje zdolność inhibicji wzrostu guza, działał słabiej. Natomiast 8-prenylonaringenina (**11**) promowała rozwój estrogenozależnego nowotworu sutka linii 16/C, co związane jest prawdopodobnie z jej aktywności estrogeną. Niższa względem flawonoidu **2**, aktywność ksantohumolu (**1**), pomimo jego silnego działania potwierdzona badaniami w *in vitro*, może być spowodowana, jego metabolizmem. Bowiem, związek ten częściowo, spontanicznie cykliczuje do izoksantohumolu (**10**), który przekształcany jest następnie za pomocą wątrobowego cytochromu CYP1A2 oraz mikroflory jelitowej do promującej rozwój nowotworu 8-prenylonaringeniny (**11**)⁵⁵. Z kolei α,β -dihydroksantohumol (**2**), nie posiadający w swej strukturze α,β -nienasyconego wiązania olefinowego, przez co nie ma możliwości cykliczacji typu chalkon-flawanon i nie jest metabolizowany do 8-prenylonaringeniny (**11**). Przeprowadzone badania, wskazują, że prenylowane flawonoidy **1** i **2** spożywane w diecie, mogą działać prewencyjnie i chronić przed rozwojem estrogenozależnych nowotworów piersi.

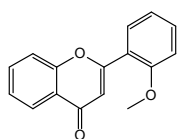
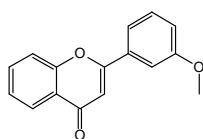
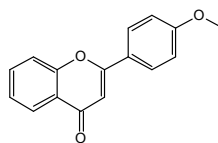
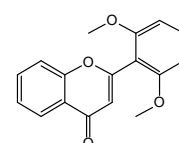
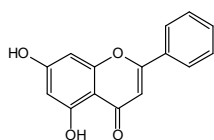
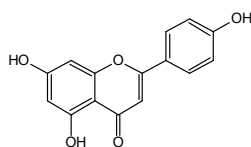
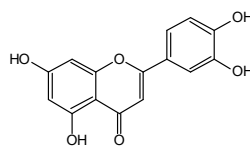
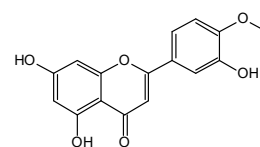
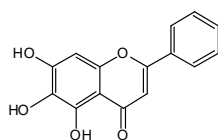
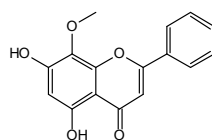
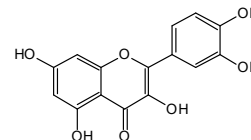
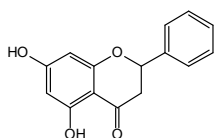
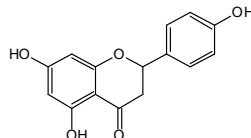
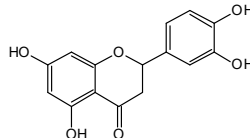
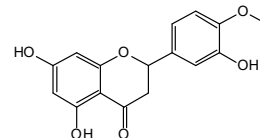
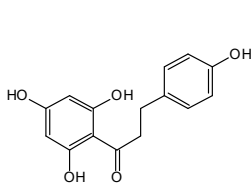
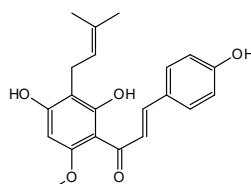
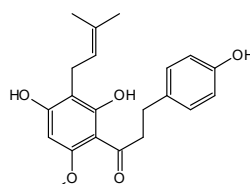
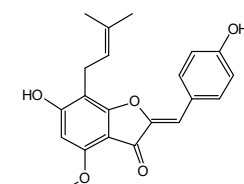
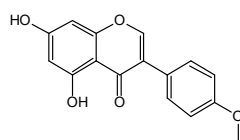
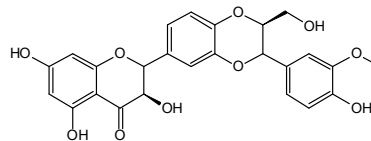
Choć ksantohumol (**1**) był głównym obiektem badań pracy doktorskiej, moje zainteresowanie przykuwały również inne, należące do klasy flawanonów, prenylowane flawonoidy chmielowe, w tym głównie izoksantohumol (**10**) i 8-prenylonaringenia (**11**). W efekcie czego brałem również udział w badaniach prowadzonych przez dr hab. Agnieszkę Bartmańska profesor uczelni, nad mikrobiologicznymi transformacjami oraz badaniem aktywności biologicznej tych związków i ich pochodnych. Wyniki tych badań opublikowano (w trakcie trwania doktoratu) w: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (Zał. 3., II, 4.2.), *Zeitschrift für Naturforschung C* (Zał. 3., II, 4.3.), *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (Zał. 3., II, 4.3.) oraz po zakończeniu doktoratu: *Zeitschrift für Naturforschung C* (Zał. 3., II, 4.8.), *Current Drug Metabolism* (Zał. 3., II, 4.9.), *Molecules* (Zał. 3., II, 4.19.), *Molecules* (Zał. 3., II, 4.20.) oraz *Zeitschrift für Naturforschung C* (Zał. 3., II, 4.26.).

Po zakończeniu doktoratu i odbytych stażach zagranicznych, w tym 26-miesięcznego stażu w Centrum Algatech w Instytucie Mikrobiologii Czeskiej Akademii Nauk w Třeboňu w Republice Czeskiej (Zał. 3., II, 11.1) oraz 2-miesięcznego stażu na Wydziale Biologii Uniwersytetu Waszyngtońskiego w Saint Louis w Stanach Zjednoczonych i (Zał. 3., II, 11.2), moje zainteresowania naukowe oprócz biotransformacji i aktywności biologicznej, poszerzyły się o biodostępność i wchłanianie flawonoidów, które z uwagi na lipofilowy charakter oraz obniżoną stabilność w roztworach są słabo wchłaniane, co znacznie limituje ich wysoki potencjał terapeutyczny. W efekcie czego złożyłem projekt badawczy do Narodowego Centrum Nauki w ramach programu SONATA 9 pt. „Otrzymywanie naturalnych flawonoidów o zwiększonej biodostępności metodami biotechnologicznymi” (Zał. 3., II, 9.5.), którego finansowanie uzyskałem. W projekcie tym pełniłem rolę **kierownika** oraz **wykonawcy**. Ze względu na fakt, iż glikozylacji, a w szczególności glikozylacja flawonoidów, może korzystnie wpływać na stabilność i wchłanianie flawonoidów, głównym celem projektu było uzyskanie na drodze mikrobiologicznych transformacji pochodnych wybranych flawonoidów o udowodnionej wysokiej aktywności biologicznej oraz ocenę czy transformacja ta może wpłynąć na zwiększenie ich biodostępności. Podstawowe założenia projektu obejmowały biotransformacje pięciu flawonoidów: chryzyny (**25**), diosmetyny (**26**), baikaleiny (**20**), wogoniny (**21**), biochaniny A (**27**) oraz flawolignanu – sylibiny (**28**). Jednak w toku realizacji projektu pulę związków **rozszerzono o piętnaście dodatkowych aglikonów flawonoidów**. Tak znaczące zwiększenie poddanych biotransformacjom związków, związane było z chęcią dokładnego poznania i przebadania procesu glikozylacji flawonoidów prowadzonych przez mikroorganizmy. Zastosowanie puli związków flawonoidowych różniących się strukturalnie, zarówno naturalnych jak i ich syntetycznych pochodnych, umożliwiło stworzenie biblioteki glikozylowanych flawonoidów należących do różnych klas (flawonów, flawanonów, chalkonów, dihydrochalkonów, auronów oraz izoflawonów). Związki te różniły się podstawnikami w pierścieniu A i B. Badania nad nimi, dostarczyły bardzo cennych informacji dotyczących czynników strukturalnych, w tym między innymi wpływu szkieletu flawonoidowego oraz położenia i obecności grup hydroksylowych oraz metoksyloowych na wydajność oraz regioselektywność reakcji glikozylacji dla danego biokatalizatora. Stworzenie dużej biblioteki związków, wiązało się również z ich syntezą chemiczną, dlatego w trakcie realizacji projektu nawiązano współpracę z pracownikiem Katedry Chemii Żywności i Biokatalizy UPWr, dr hab. Tomaszem Janeczko profesorem uczelni oraz jego zespołem. W efekcie czego powstały trzy oryginalne prace naukowe opublikowane w: *International Journal of Molecular Sciences* (Zał. 3., II, 4.24.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Zał. 3., II, 4.27.) oraz *International Journal of Molecular Sciences* publikacja **P5**.

Wyniki otrzymane w trakcie realizacji projektu stanowią również część dysertacji doktorskiej: dr Sandry Sordon „Otrzymywanie biologicznie aktywnych flawonoidów na drodze biotransformacji” (data obrony 09.10.2018) oraz dra Mateusza Łuznego „Synteza i biotransformacje wybranych związków flawonoidowych” (Data obrony 22.10.2021)

Na rysunku 15 przedstawiono wszystkie flawonoidy, które poddano procesowi mikrobiologicznych transformacji w badaniach skринingowych oraz reakcjach preparatywnych w trakcie realizacji niniejszego projektu. Efektem biotransformacji substratów przedstawionych na rysunku 15 było

otrzymanie 52 glikozylowanych pochodnych flawonoidowych, spośród których, wiele to związki, które wcześniej nie były publikowane w literaturze.

2'-metoksyflawon **29**3-metoksyflawon **30**4'-metoksyflawon **31**2',6'-dimetoksyflawon **32**chryzyna **25**apigenina **33**luteolina **34**diosmetyna **26**bajkaleina **20**wogonina **21**kwercetyna **13**pinocebryna **35**naringenina **36**eriodiktiol **37**hesperetyna **38**floretyna **39**ksantohumul **1** α,β -dihydroksantohumul **2**auron ksantohumolu **3**biochanina A **40**sylibina **28**

Rysunek 15. Aglikony flawonoidów poddane mikrobiologicznym glikozylacjom w trakcie realizacji projektu „Otrzymywanie naturalnych flawonoidów o zwiększonej biodostępności metodami biotechnologicznymi”

W celu wyselekcjonowania mikroorganizmów zdolnych do katalizowania reakcji regioselektywnej glikozylacji przeprowadzono szerokie badania selekcyjne z wykorzystaniem ponad 60 mikroorganizmów należących do grzybów strzępkowych oraz drożdży, zdeponowanych w kolekcjach mikroorganizmów Katedry Chemii Żywności i Biokatalizy oraz Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Na podstawie otrzymanych wyników wyselekcjonowano

19 szczepów zdolnych do prowadzenia regioselektywnej reakcji glikozylacji flawonoidów. Przyłączanym cukrem najczęściej były β -D-metyloglukopiranoza i β -D-4-O-metyloglukopiranoza, rzadziej ramnoza.

W celu określenia optymalnych warunków mikrobiologicznej glikozylacji katalizowanej przez grzyby strzępkowe przebadano m.in. wpływ pH (w zakresie od pH=3,5 do pH=7 stosując bufony fosforanowe $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ oraz $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ o stężeniu 50, 100, 150 oraz 200 mM) oraz dodatek UDP (urydyno-5'-difosforan sodu, będącego substratem dla UDP-zależnych glikozylotransferaz, w stężeniu 10, 20 40 μM) na wydajność procesu.

W celu określenia możliwości rozprowadzania glikozylowanych flawonoidów w organizmie nawiązano współpracę z zespołem prof. dr hab. Janiny Gabrielskiej z Katedry Fizyki i Biofizyki Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W ramach której zbadano możliwości wiązania niektórych z otrzymanych glikozydów z ludzką albuminą surowicy krwi, w tym m.in. mechanizm wiązania, siłę wiązania i rodzaje oddziaływań między flawonoidem i albuminą. W efekcie współpracy powstały dwie publikacje naukowe opublikowane w czasopiśmie: *Molecules* (Zał. 3., II, 4.16.) oraz *Molecules* publikacja **P1**. Wyniki otrzymane w toku realizacji projektu i opublikowane (Zał. 3., II, 4.16.), stanowią część dysertacji doktorskiej dr inż. Pauliny Strugały-Danak pt. „Aktywne biologicznie ekstrakty z owoców i ich oddziaływanie z biomolekułami” (Data obrony: 15.12.2007), której byłem **promotorem pomocniczym**.

Cześć z otrzymanych glikozydów flawonoidów przebadano również pod kątem farmakokinetycznym w badaniach *in vivo* na modelu mysim we współpracy z zespołem prof. dr hab. Joanny Wietrzyk z Instytutu Immunologii oraz Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, wykorzystując do analiz opracowane w trakcie projektu metody ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z wysokorozdzielczym spektrometrem mas (UHPLC-HR-ESI-qTOF-MS/MS)

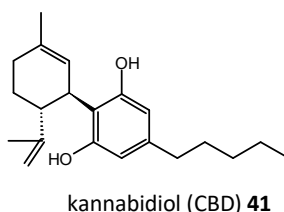
Podsumowując, osiągnięcie naukowe jakim było realizacja projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu SONATA 9 pt. „Otrzymywanie naturalnych flawonoidów o zwiększonej biodostępności metodami biotechnologicznymi” (Zał. 3., II, 9.5.), którego byłem **kierownikiem** oraz **wykonawcą**, w toku realizacji badań powstało **siedem oryginalnych prac**, które opublikowano w renomowanych czasopismach naukowych: *Molecules* (Zał. 3., II, 4.16.), *Molecules* publikacja **P1**, *Bioorganic Chemistry* (Zał. 3., II, 4.22.), *International Journal of Molecular Sciences* (Zał. 3., II, 4.24.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Zał. 3., II, 4.27.), *International Journal of Molecular Sciences* publikacja **P3** oraz *International Journal of Molecular Sciences* publikacja **P5**.

Przeprowadzone badania charakteryzowały się innowacyjnością, o czym świadczą uzyskane **dwadzieścia dwa patenty** Urzędu Patentowego RP (Zał. 3., III, od 3.1.1. do 3.1.4. oraz od 3.1.7. do 3.1.21. oraz 3.1.23. do 3.1.25.) oraz **sześć zgłoszeń ochrony patentowej** (Zał. 3., III, od 3.2.14. do 3.2.18. oraz 3.2.20.) z zakresu nowych naturalnych związków o potencjale terapeutycznym oraz metod ich otrzymywania.

Wyniki otrzymane w ramach realizacji projektu prezentowano na **4 konferencjach międzynarodowych** (Zał. 3., II, 7.1.54., 7.1.56., 7.1.61., 7.1.63.).

Szerokie badania prowadzone z wykorzystaniem flawonoidów, w tym ich otrzymywanie na drodze biotransformacji oraz doświadczenie w prowadzeniu mikrobiologicznych glikozylacji z wykorzystaniem grzybów strzępkowych przez zespół badawczy prof. dr hab. inż. Ewy Huszczy, którego jestem członkiem, zaowocowało zaproszeniem do realizacji zadania badawczego w międzynarodowym projekcie naukowo-przemysłowym SynBio4Flav „Synthetic microbial consortia-based platform for flavonoids production using synthetic biology” z unijnego programu badań i innowacji Horyzont 2020 (Zał. 3., II, 9.3.). Jako **wykonawca**, zaangażowany były m.in. w opracowanie metod analitycznych z wykorzystaniem ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC), umożliwiającej oznaczanie dużego panelu związków flawonoidowych, w tym aglikonów oraz ich hydroksylowanych oraz glikozylowanych pochodnych.

Zagadnienie biotransformacji, aktywności biologicznej i biodostępności flawonoidów nie jest jedynym nurtem badawczym, jaki jest w kręgu moich zainteresowań. Wśród naturalnych, bioaktywnych związków jakie posiadają w swej strukturze grupy fenolowe są kannabinoidy, naturalnie wytwarzane przez konopie (*Cannabis sativa* ssp. *sativa*, *C. sativa* ssp. *indica*, oraz *C. sativa* ssp. *ruderalis*) – które wraz z chmielem, należą do tej samej rodziny konopiowatych. Związki te, podobnie jak prenylowane flawonoidy, posiadają grupy fenolowe oraz izoprenoidowe. Jednym z najaktywniejszych biologicznie związków z tej grupy jest kannabidiol (CBD) (**41**), którego strukturę przedstawiono poniżej.



Rysunek 16. Struktura chemiczna kannabidiolu (**41**)

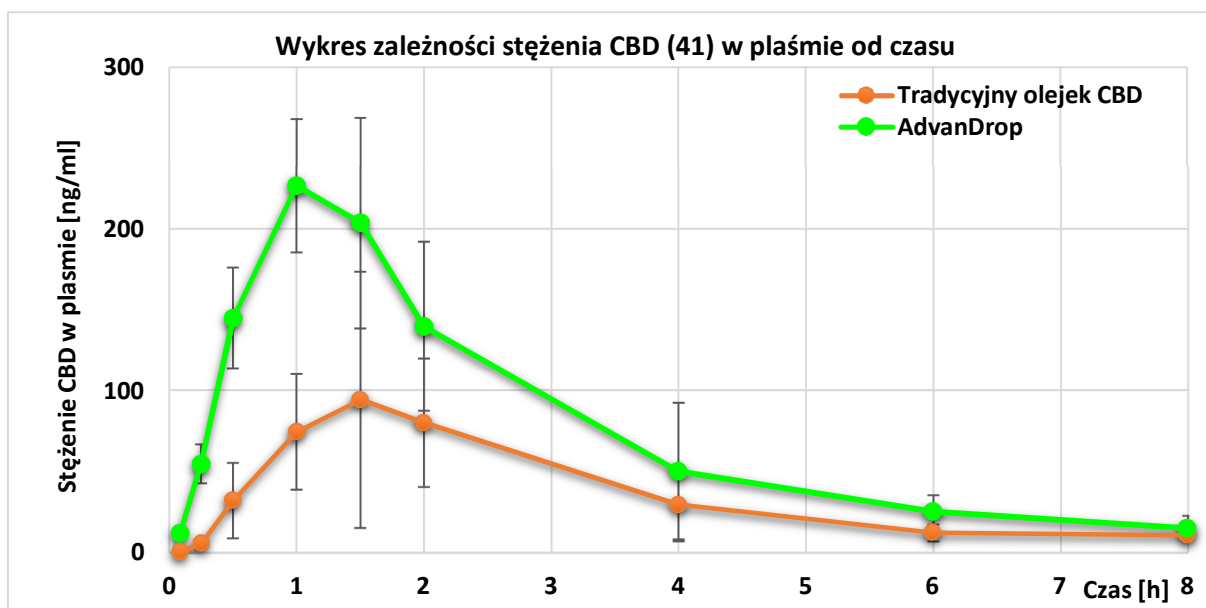
Kannabidiol (**41**), będący niepsychoaktywnym związkiem z konopi, wykazuje dużą aktywność biologiczną. Związek ten pod handlową nazwą Epidyolex[®] stosowany jest w leczeniu napadów padaczkowych związanych: z zespołem Lennox-Gastaut (LGS), z zespołem Dravet (DS) oraz związanych z zespołem stwardnienia guzowatego (ang. tuberous sclerosis complex, TSC) oraz jako Sativex[®] - będący mieszaniną CBD i Δ^9 -THC w stosunku masowym 1:1, wykorzystywany w leczeniu spastyczności mięśni o umiarkowanym lub ciężkim przebiegu, u pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane. Związek ten jest obecnie testowany klinicznie na wiele schorzeń, z czym wiąże się duże nadzieje. Badany jest w leczeniu zaburzeń psychotycznych, stanów lękowych, bezsenności, chorobie Parkinson'a, Leśniowskiego-Crohna oraz COVID-19 we wczesnych stadiach zakażenia, ponadto wykazuje on silne właściwości przeciwzapalne i przeciwbólne¹¹⁷⁻¹²¹.

Nierefundowany lek Epidyolex[®], jest bardzo kosztowny, szacuje się bowiem, że cena kuracji może wynosić 200-250 tys. zł rocznie przy założeniu wagi pacjenta 45-55 kg. (https://bipold.aotm.gov.pl/assets/files/zlecenia_mz/2021/111/SRP/U_43_252_13092021_s_112_Epidyolex_cannabidiolum_import_doc_zacz_REOPTR.pdf).

Dlatego pacjenci, w tym w szczególności cierpiący na lekooporną padaczkę, dla której CBD (**41**) może być jedynym skutecznym lekarstwem, często wybierają kilkadziesiąt razy tańszą alternatywę, dostępne

powszechnie na rynku, suplementy diety - olejki CBD. Olejki te zawierają CBD (**41**), lub ekstrakt z kwiatostanów konopi siewnej zawieszony w oleju (najczęściej konopnym lub MCT). „Lek” w tej postaci stosowany jest najczęściej poprzez podanie kilku/kilkunastu kropli olejku podjęzykowo. Taka forma podaży, jest niestety mało skuteczna, kannabinoidy, bowiem podobnie jak flawonoidy, ze względu na swój lipofilowy charakter wykazuje słabą rozpuszczalność w wodzie, co wpływa znacząco na ich niską biodostępność. Podanie kannbinoidów rozpuszczonych w oleju tylko nieznacznie zwiększa ich wchłanianie.

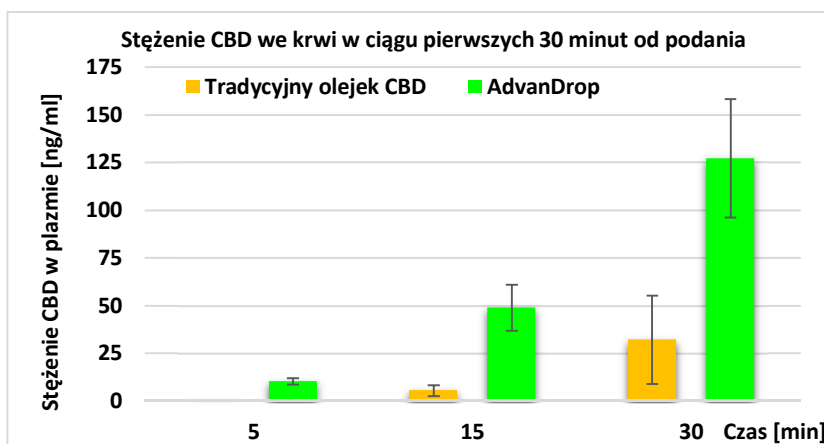
W 2020 roku wraz z dr inż. Grzegorzem Kiełbowiczem oraz dr inż. Pawłem Mitułą stworzyliśmy we Wrocławski Parki Technologicznym (WPT) biotechnologiczno-farmaceutyczny Start-Up Healthcann Sp. z o.o., którego głównym celem było stworzenie nowoczesnej technologii umożliwiającej szybsze i skuteczniejsze wchłanianie substancji lipofilowych, w tym kannabinoidów, w celu tworzenia innowacyjnych leków. W tym celu wystąpiliśmy o finansowanie projektu badawczego do Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, które uzyskaliśmy (Zał. 3., II, 9.2.), byłem jego **wykonawcą**. W ramach realizacji projektu stworzyliśmy innowacyjną technologię zarejestrowaną pod nazwą AdvanDrop®, która umożliwia rozpuszczanie kannabinoidów w wodzie. Opracowana technologia stanowi nośnik dla rozpuszczonej w niej aktywnej substancji lipofilowej, a dodana do wody, po delikatnym mieszaniu, natychmiast tworzy nanokrople (nanoemulsję o średnicy kropli od 40 nm.) w której rozpuszczony jest CBD (**41**). Dzięki tak niewielkim rozmiarom, nanokrople bez problemu przenikają przez błonę śluzową m.in. jamy ustnej i są natychmiast rozprowadzane (głównie przez układ limfatyczny) po organizmie. W celu potwierdzenia skuteczności technologii w zwiększaniu biodostępności i wchłaniania CBD (**41**) z układu pokarmowego po podaniu doustnym, przeprowadziliśmy badania farmakokinetyczne *in vivo* na szczurach, w renomowanym fińskim laboratorium Admescope, które współpracuje z licznymi ośrodkami badawczymi na świecie. Niezależne badania dowiodły skuteczności działania technologii AdvanDrop®, w porównaniu do tradycyjnie podawanych podjęzykowo kropli CBD (rysunek 17).



Rysunek 17. Wykres zależności stężenia CBD (**41**) po podaniu doustnym tradycyjnego olejku CBD oraz CBD w technologii AdvanDrop® (oba testowane produkty zawierały to samo stężenie CBD **41**)

CBD (**41**) podawane w technologii AdvanDrop® wchłania się blisko 200% lepiej ($AUC_{0 \rightarrow 8h}$), osiągając 2,5-krotnie wyższe stężenie maksymalne (C_{max}) w stosunku do tradycyjnego oleju.

Przy leczeniu objawowym schorzeń takich jak ostre bóle, stany lękowe czy napady padaczkowe, fundamentalne znaczenie ma szybkość działania terapeutycznego. Przeprowadzone badania dowiodły, ogromnej przewagi CBD (**41**) w technologii AdvanDrop® w stosunku do tradycyjnego oleju podawanego podjęzykowo. Po 5 minutach od momentu doustnego podania, stężenie CBD (**41**) w technologii AdvanDrop® było aż **26-krotnie wyższe** niż tradycyjnego oleju CBD (rysunek 18).



Rysunek 18. Stężenie CBD (**41**) we krwi w ciągu pierwszych 30 minut po podaniu doustnego, tradycyjnego olejku CBD oraz CBD w technologii AdvanDrop®

Opracowana technologia AdvanDrop® została zgłoszona do ochrony patentowej w Urzędzie Patentowym RP (Zał. 3., III, 3.19.) oraz **do ochrony międzynarodowej** (nr zgłoszenia PCT/PL2021/050035) oraz **wdrożona do produkcji innowacyjnych produktów zawierających CBD (**41**)** w tym trzech produktów w postaci rozpuszczalnych w wodzie kropli CBD (**41**) oraz pastylek do ssania z CBD (**41**) produkowanych w standardach farmaceutycznych (nazwa handlowa Canaticann®) (Zał. 3., III., 4.).

Aktualnie Start-Up opracowuje i bada inne, nowoczesne technologie dostarczania substancji aktywnych o wysokim potencjale terapeutycznym, zwiększając ich szybkość działania oraz biodostępność w celu opracowania nowoczesnych, innowacyjnych i skutecznych produktów m.in. dla przemysłu farmaceutycznego, w ramach finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju projektu badawczego, którego jestem **kierownikiem B+R** (Zał. 3., II, 9.1.).

Podsumowując osiągnięcia naukowe, moje dotychczasowe badania, skupiały się w dużej mierze na szeroko pojętej grupie metabolitów, w tym pochodzących z roślin flawonoidów oraz kannabinoidów, otrzymanych na drodze biotransformacji ich produktów metabolizmu mikroorganizmów oraz metabolitów wtórnych biosyntezy przez bakterie fotosyntetyzujące. Kluczowe w realizacji badań było otrzymywanie pochodnych, w tym nowych, nie opublikowanych dotąd związków na drodze mikrobiologicznych transformacji, opracowanie metod ich analizy, izolowania i oczyszczania, co umożliwiło ich późniejsze badania biologiczne, określenie czynników strukturalnych wpływających na aktywność, biodostępność i cytotoksyczność. Od rozpoczęcia doktoratu realizowałem badania w ramach dziewięciu projektów badawczych (Zał. 3., II, 9.1.-9.9.) z czego w trzech pełniłem funkcję

kierownika (Załącznik 3. II, 9.1., 9.4., 9.5.). Pięć spośród realizowanych projektów współfinansowane były z funduszy Unii Europejskiej (Załącznik 3. II, 9.1.-9.3., 9.7., 9.8.), trzy były projektami naukowo-przemysłowymi (Załącznik 3., II, 9.1.-9.3.) a dwa projekty były międzynarodowe (Załącznik 3., II, 9.3., 9.7.). Wiele z badań okazało się innowacyjnymi, co zaowocowało uzyskaniem **61 patentów** (Załącznik 3., III, 3.1.). **20** kolejnych wynalazków **zostało zgłoszone do ochrony** (Załącznik 3., III, 3.2.). Opracowana, nowa, innowacyjna technologia AdvanDrop® poprzez skuteczne rozpuszczanie w wodzie, znacząco zwiększa szybkość działania i wchłanianie kannabidiolu (CBD) (**41**), leku wykorzystywanemu m.in. w leczeniu epilepsji i stwardnieniu rozsianym. Technologia ta **została zgłoszona do ochrony międzynarodowej** (zgłoszenie w Urzędzie Patentowym RP, Załącznik 3., III, 3.19., zgłoszenie do ochrony międzynarodowej (PCT/PL2021/050035) oraz **wdrożona do produkcji**, na rynku dostępne są cztery produkty wykorzystujące tę innowacyjną technologię.

Moje dalsze plany naukowe, to kontynuowanie badań dotyczących biotechnologicznych metod otrzymywania związków o wysokiej aktywności biologicznej, w tym selektywnie hamujących nowotwory oraz badanie ich metabolizmu, określanie właściwości biologicznych oraz czynników strukturalnych decydujących o potencjale terapeutycznym. Ponadto chciałbym kontynuować prace nad opracowaniem metod wpływających na szybsze i wydajniejsze wchłanianie związków bioaktywnych takich jak flawonoidy, kannabinoidy oraz substancje aktywne leków (API) z układu pokarmowego, co ma fundamentalne znaczenie przy skutecznym leczeniu oraz obniżaniu ich stężenia w celu minimalizowania skutków ubocznych i niepożądanego działania.

Podsumowując mój dorobek naukowy (dane na dzień 25.08.2023), łącznie z publikacjami wchodzącymi w skład osiągnięcia naukowego wymienionego w pkt. 4 autoreferatu, jestem współautorem 30 publikacji (wszystkie z bazy JCR) z czego 28 to oryginalne prace twórcze, a 2 to artykuły przeglądowe.

Sumaryczny wskaźnik oddziaływania (IF) wynosi **99,071**.

Suma punktów MEiN za publikacje naukowe wynosi **1773**.

Liczba cytowań publikacji według bazy:

- Web of Science wynosi **605** (w tym bez autocytowań: **480**), h-indeks = **16**,
- Scopus wynosi **621** (w tym bez autocytowań **480**), h-indeks = **17**,
- Google Scholar wynosi **765**, h-indeks = **17**.

Wyniki badań prezentowałem w formie 3 wykładów na zaproszenie oraz 4 referatów wygłoszonych w języku angielskim. Wyniki badań, których jestem współautorem prezentowane były w postaci 61 komunikatów konferencyjnych. Otrzymałem dziesięć Nagród Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu:

- Nagroda zespołowa za osiągnięcia naukowe 19.05.2023
- Nagroda zespołowa za osiągnięcia naukowe, 21.05.2022
- Nagroda zespołowa III stopnia za osiągnięcia naukowe, 15.11.2021
- Nagroda zespołowa III stopnia za osiągnięcia naukowe, 15.11.2020
- Nagroda III stopnia w dziedzinie dydaktycznej, w szczególności za najwyższą ocenę w ankiecie studentów w semestrze zimowym roku akademickiego 2017/2018, 15.11.2019

- Nagroda zespołowa II w dziedzinie badań naukowych za cykl publikacji dotyczących mikrobiologicznych przekształceń polifenoli oraz oceny ich aktywności biologicznej, 24.11.2018
- Nagroda zespołowa III stopnia w dziedzinie naukowej, w szczególności za cykl publikacji i patentów dotyczących mikrobiologicznych i chemicznych przekształceń związków naturalnych, 14.11.2017
- Nagroda zespołowa I stopnia za osiągnięcia naukowe a w szczególności za uzyskanie 13 patentów w roku 2015 dotyczących metod otrzymywania biologicznie aktywnych flawonoidów, mogących znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, 14.11.2016
- Nagroda II stopnia za osiągnięcia naukowe a w szczególności za współautorstwo cyklu publikacji dotyczących mikrobiologicznych i fotochemicznych przekształceń flawonoidów, 22.11.2014
- Nagroda zespołowa II stopnia za osiągnięcia naukowe a w szczególności za pracę doktorską pt.: „Mikrobiologiczne transformacje związków biologicznie czynnych pochodzących z chmielu oraz ich pochodnych”, 13.11.2013

Szczegółowy wykaz mojego dorobku naukowego zawiera załącznik 3, a jego podsumowanie przedstawia tabela poniżej.

Tabela 3. Podsumowanie działalności naukowo-badawczej

| Kategorie opracowań | Przed doktoratem | | | Po doktoracie | | | Łącznie | | |
|--|------------------|-------------|-------|---------------|-------------|--------|---------|-------------|--------|
| | Liczba | Punkty MEiN | IF | Liczba | Punkty MEiN | IF | Liczba | Punkty MEiN | IF |
| Oryginalne prace twórcze w czasopismach z IF | 3 | 53 | 3,894 | 25 | 1535 | 87,278 | 28 | 1588 | 91,172 |
| Artykuły przeglądowe | 0 | 0 | 0 | 2 | 135 | 7,899 | 2 | 135 | 7,899 |
| Razem publikacje | 3 | 53 | 3,894 | 27 | 1670 | 95,177 | 30 | 1723 | 99,071 |
| Patenty | 4 | 100 | - | 57 | 3195 | - | 61 | 3295 | - |
| RAZEM liczba opracowań; punkty MEiN, IF | 7 | 153 | 3,894 | 84 | 4865 | 95,177 | 91 | 5018 | 99,071 |


(podpis wnioskodawcy)