

Marta Kula, \*Mirostawa Krauze-Baranowska, Natalia Adamczuk

# Urolityny – aktywne biologicznie produkty metabolizmu elagotanin

## Urolithins – biologically active products of ellagitannin metabolism

Katedra i Zakład Farmakognozji, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny  
Kierownik Katedry: prof. dr hab. n. farm. Mirostawa Krauze-Baranowska

### SUMMARY

*Ellagitannins are a group of secondary metabolites found in nuts and many fruits such as pomegranates, raspberries, strawberries, blackberries and cranberries. The biologically active products of ellagitannin metabolism in the human body, depending on the composition of the intestinal microbiome, are urolithins A, B, C or D. The work presents the results of research on the biological activity of urolithins, including anti-inflammatory, antioxidant, chemopreventive, modulation of estrogenic receptors and neuroprotective activity. The positive effect of urolithins in inflammatory bowel diseases as well as in diseases of the cardiovascular system is characterized. In addition, the beneficial properties of urolithins in metabolic syndrome, including an anti-glycemic and neuroprotective effect, have been described.*

**Keywords:** urolithins, ellagitannins, biological activity

### STRESZCZENIE

*Elagotaniny są grupą metabolitów wtórnych obecnych w orzechach i wielu owocach, takich jak: granaty, maliny, truskawki, jeżyny i żurawiny. Aktywnymi biologicznie produktami metabolizmu elagotanin w organizmie człowieka, w zależności od kompozycji mikrobiomu jelitowego, są urolityny A, B, C lub D. W pracy scharakteryzowano dotychczasowe wyniki prac nad aktywnością biologiczną urolityn, m.in.: przeciwzapalną, antyoksydacyjną, chemoprewencyjną, modulacją receptora estrogenowego i neuroprotekcijną. Wskazano na pozytywne efekty urolityn m.in. w leczeniu nieswoistego zapalenia jelit, a także chorób układu sercowo-naczyniowego. Ponadto opisano korzystne właściwości elagotanin w zespole metabolicznym, w tym działanie przeciwglukemiczne i neuroprotekcyjne.*

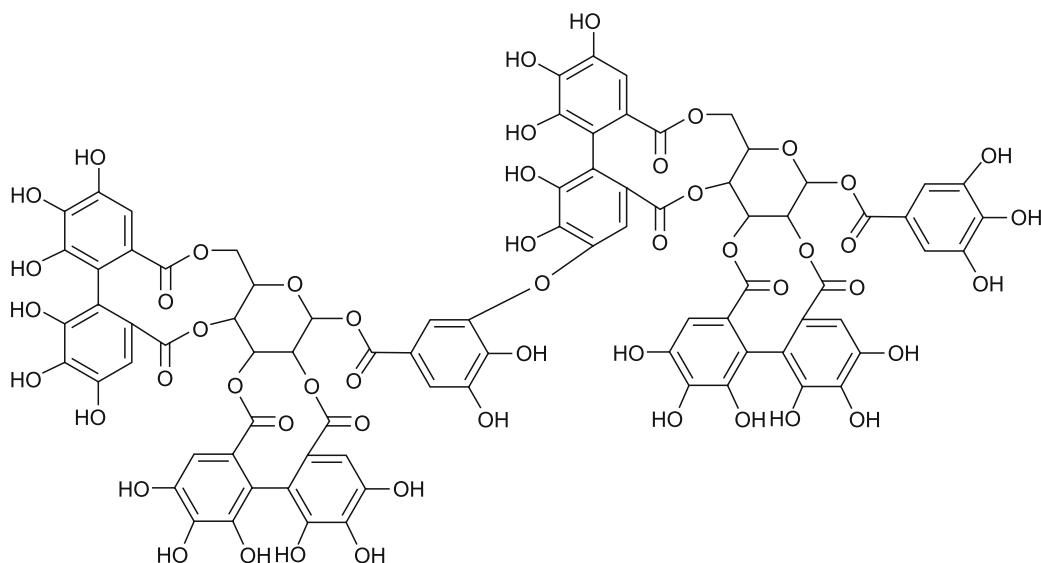
**Słowa kluczowe:** urolityny, elagotaniny, aktywność biologiczna

## Urolityny – aktywne biologicznie produkty metabolizmu elagotanin

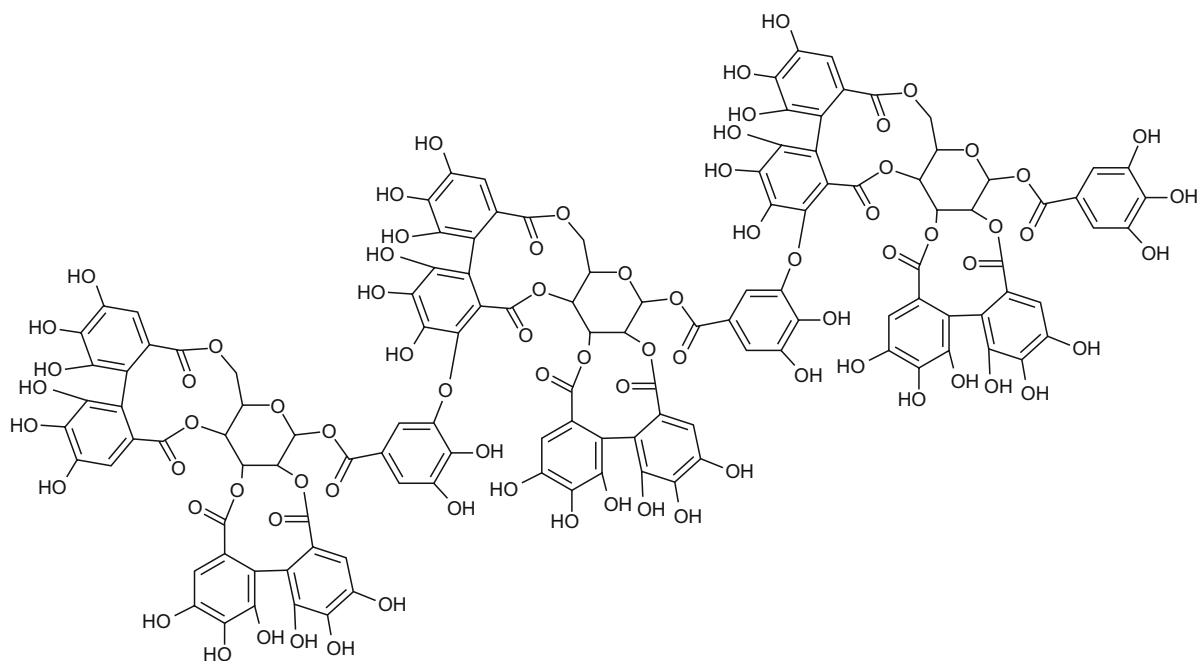
Elagotaniny są estrami kwasu heksahydroksydifenylowego (HHDP) oraz monocukrów (glukoza) (1-5). Jedną z właściwości elagotanin jest ich hydroлиза w środowisku kwaśnym i zasadowym z uwolnieniem kwasu heksahydroksydifenylowego, który przekształca się (laktonizacja) w kwas elagowy (1, 5, 6). Elagotaniny z ugrupowaniem HHDP, posiadającym wiązanie C-C między fragmentami galoilowymi, estryfikującymi szkielet glukozy, są szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym. Podstawowe biarylowe wiązanie C-C obejmuje przede wszystkim galoilowe grupy estryfikujące cząsteczkę glukozy w pozycjach węgla C -2,3- i -4,6-; spotykane są również wiązania w pozycjach C -1,6-, -1,3- lub -3,6- i/lub -2,4- (1, 7). Do grupy elagotanin zaliczane są związki

o charakterze monomerów (np. nufaryna A), oligomerów (nufaryna E) oraz polimerów (10).

Elagotaniny o charakterze oligomerów dominują w owocach różnych odmian uprawowych maliny właściwej *Rubus idaeus* (8); są to sangwina H-6 (ryc. 1) oraz lambertianina C (ryc. 2) (3). W świecie roślinnym obok owoców maliny bogatym źródłem elagotanin są również inne owoce gatunków z rodziny *Rosaceae*: owoce truskawki, jeżyny oraz róży (1, 9); z rodziny *Saxifragaceae*: owoce czarnej porzeczki; z rodziny *Ericaceae*: owoce czarnej jagody i żurawiny. Wyjątkowo bogate w elagotaniny są owoce granatu i winorośli. Ponadto elagotaniny w wysokich stężeniach są obecne w owocach i nasionach o zdrewniałej owocni – orzechach włoskich, pistacjach, orzechach pekan (nasiona orzesznika jadalnego), orzechach nerkowca, a także w orzechach dębu i nasionach kasztanowca (10). Elagotaniny mogą być wytrawiane z drewna np. dębowego, z którego wykonane są beczki,



Ryc. 1. Wzór strukturalny sangwiny H-6



Ryc. 2. Wzór strukturalny lambertaniny C

i przechodzić do dojrzewającego w nich wyrobu alkoholowego (wino).

Elagotaniny wykazują prozdrowotne właściwości i znaczącą aktywność biologiczną: przeciwzapalną, przeciwmiażdżycową, przeciwzakrzepową i antyangiogenną, stąd klasyfikowane są jako nutraceutyki. Badania potwierdziły związek między spożyciem żywności bogatej w elagotaniny (orzechy włoskie, owoce granatu) a poprawą funkcji układu sercowo-naczyniowego. Obecnie na rynku dostępnych jest wiele produktów z wyciągami roślinnymi, zawierającymi elagotaniny i kwas elagowy (10).

Ze względu na szerokie spektrum aktywności biologicznej elagotanin i kwasu elagowego (11) w licznych pracach badano ich absorpcję z przewodu pokarmowego oraz dystrybucję w organizmie (12-28).

### Metabolizm elagotanin oraz ich biodostępność

W badaniach na modelach zwierzęcych oraz w badaniach u ludzi wykazano, że absorpcja elagotanin z przewodu pokarmowego jest ograniczona (12-15). U szczurów długotrwale spożywających znaczne ilości

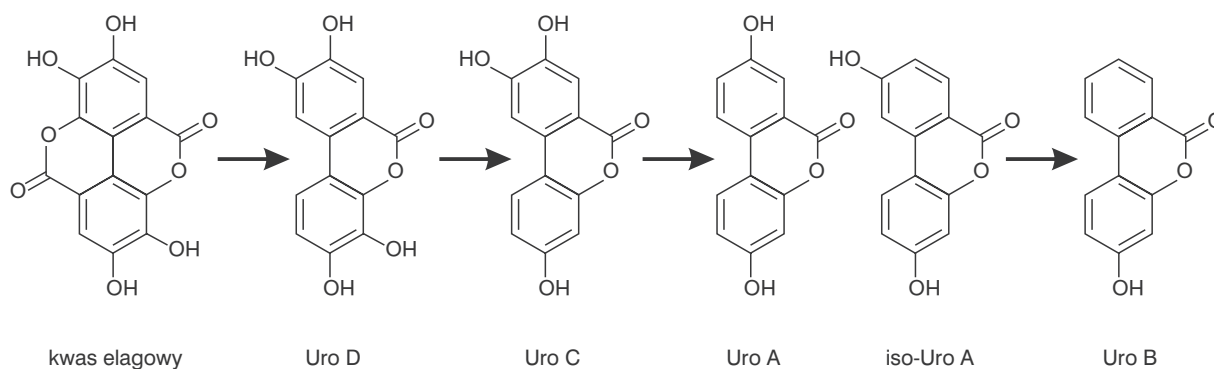
elagotanin jedynie 3-6% było obecnych w formie niezmetabolizowanej w moczu i osoczu (12), podczas gdy u ludzi nie stwierdzono ich obecności w żadnym z płynów ustrojowych (13-15). Ustalono natomiast, że większość elagotanin jest metabolizowana przez mikroflorę jelitową do związków zwanych urolitynami.

Po spożyciu, elagotaniny (ET) ulegają degradacji w kwaśnym środowisku przewodu pokarmowego, hydrolizując z uwolnieniem kwasu heksahydroksydifenowego (HHDP), który na drodze laktonizacji przekształca się w kwas elagowy (EA) (16). Badania płynnej treści jelitowej od pacjentów z ileostomią sugerują, że ok. 80% sangwiny H-6 ulega nahydrolizie do kwasu elagowego w żołądku oraz w jelicie cienkim (15). Ponadto 80% wolnego kwasu elagowego jest przekształcane przez mikroflorę jelita grubego w urolityny, poprzez otwarcie i dekarboksylację jednego z pierścieni laktonowych i degradację kolejnych grup hydroksylowych. W wyniku tego procesu powstają urolityny tetrahydroksylowe (urolityna D, Uro D), trihydroksylowe (urolityna C, Uro C), dihydroksylowe (urolityna A, Uro A i izourolityna A iso-Uro A) oraz monohydroksylowe (urolityna B, Uro B), które są pochodnymi 6H-dibenzo- $\beta$ -D-piran-6-onu (ryc. 3) (13, 15-21).

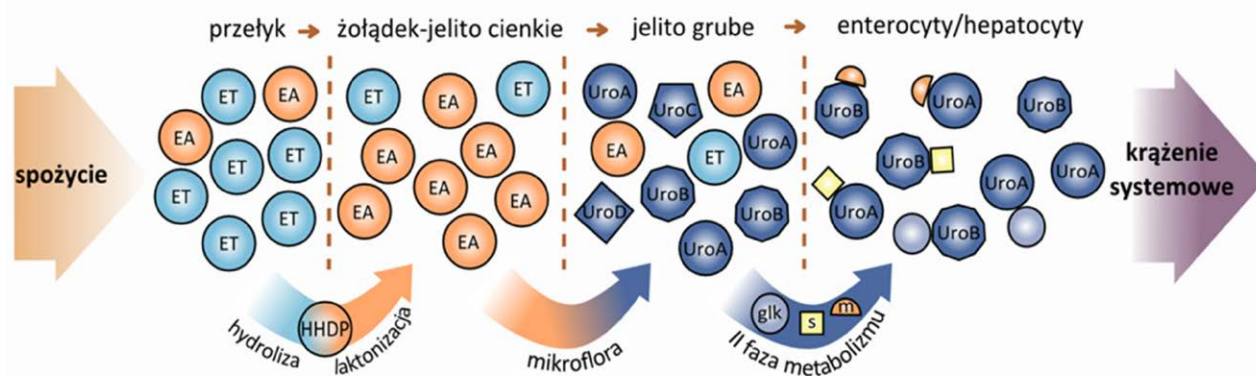
Po absorpcji w jelicie grubym w II fazie metabolizmu urolityny ulegają metylacji, glukuronidacji i sulfonacji, które zachodzą w ścianie jelita, bądź w wątrobie (ryc. 4) (15, 17, 18). Obecnie uważa się, że urolityny są formą biodostępną elagotanin, ulegającą absorpcji i dystrybucji do tkanek *in vivo* (15, 17, 19-21). W oparciu o badania na modelach zwierzęcych u myszy i świni iberyjskiej stwierdzono obecność urolityn w hepatocytach (19, 20), woreczku żółciowym oraz żółci wydzielanej do dwunastnicy (19), co sugeruje, że urolityny i ich glukuronidy są włączane do obiegu jelitowo-wątrobowego.

Obecność urolityn wykazano również w innych tkankach (20, 21). Urolityny (Uro A i jej glukuronid) wykryto w niskich stężeniach w gruczole krokowym i nerkach u myszy (20) oraz w gruczole krokowym u ludzi. Wyniki biopsji prostaty wykazały obecność glukuronidu urolityny A w stężeniu 2 ng/g i śladowe ilości glukuronidu urolityny B (21). Inne tkanki badane w zakresie akumulacji urolityn i ich pochodnych w modelach zwierzęcych obejmowały tkankę mięśniową, tłuszczową i sercową, niemniej jednak w żadnej z nich nie ujawniono ich obecności (17, 19).

Urolityny przechodzą do krwi i są wydalane z moczem. W płynach ustrojowych u ludzi wykryto



Ryc. 3. Schemat konwersji kwasu elagowego do urolityn (17)



Ryc. 4. Metabolizm elagotanin i kwasu elagowego

obecność Uro A-D oraz szeregu ich glukuronidowych, sulfonowych i metylowych pochodnych, z dominującym glukuronidem urolityny A (ryc. 4) (12-15, 17, 19, 22-24). Metabolity elagotanin są wykrywane w moczu po 1-2 dniach od spożycia produktów będących ich źródłem, takich jak: maliny, truskawki, orzechy i owoce granatu. Zarówno w moczu, jak i we krwi obserwowane jest duże zróżnicowanie osobnicze w zakresie oznaczonych stężeń urolityn (14, 15, 19, 25). Uważa się, że skład flory bakteryjnej jelita grubego wpływa na różnice w stężeniach i produkcji poszczególnych urolityn (14, 15, 25, 26).

Na podstawie dotychczasowych badań u ludzi można wyróżnić trzy grupy różniące się metabolizmem elagotanin: grupę produkującą głównie urolitynę A (25-80%), grupę metabolizującą głównie do urolityny B (10-50%) oraz grupę, u której nie obserwuje się produkcji urolityn (5-25%). Przynależność do danej grupy nie jest skorelowana z płcią, wiekiem, BMI, ilością oraz źródłem spożytych elagotanin. Obserwowano natomiast, że Uro B częściej produkują pacjenci z przewlekłymi schorzeniami, takimi jak: zespół metaboliczny, nowotwór jelita grubego czy dysbioza jelitowa (27). U 10-50% ludzi, oprócz urolityny A, obserwowano produkcję jej izomeru – izourolityny A (iso-Uro A) (28).

### Aktywność biologiczna urolityn

W świetle ostatnich wyników badań przyjmuje się, że to urolityny, a nie formy natywne elagotanin, są w głównej mierze odpowiedzialne za obserwowane efekty biologiczne *in vivo*. Skutkuje to wzrostem liczby prac dotyczących ich aktywności biologicznej (14, 28-60).

### Aktywność antyoksydacyjna

Dotychczasowe wyniki badań aktywności antyoksydacyjnej urolityn są rozbieżne. W testach z użyciem DPPH i redukcji rodnika ABTS [2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)] wykazano, że w porównaniu z elagotaninami urolityna A charakteryzuje się bardzo niską aktywnością antyoksydacyjną, ok. 42 razy słabszą w teście DPPH oraz aż 3500 razy słabszą w teście ABTS (14). Podobnie w badaniach Larrosa i wsp. (29) wartości  $IC_{50}$  urolityn w szeregu testów oksydacyjnych (m.in. z DPPH i NADH) wynosiły powyżej 100  $\mu$ M, jakkolwiek urolityny, a w szczególności Uro A w teście ORAC (ang. *oxygen radical absorbance capacity*), badającym zdolność pochłaniania reaktywnych form tlenu, wykazywały aktywność podobną do kwasu askorbinowego. Wyniki te są zgodne z innymi badaniami porównującymi właściwości antyutleniające związków fenolowych (m.in. flawonoli, flawan-3-oli, kwasów fenolowych) i ich metabolitów

metodą ORAC, spośród których urolityna A była jednym z najsilniejszych antyoksydantów (30).

Przeciwutleniający potencjał urolityn badano również w komórkowym teście antyoksydacyjnym. W badaniach na linii HL-60 stwierdzono, że urolityny C i D są najsilniejszymi antyoksydantami z wartościami  $IC_{50}$  wynoszącymi odpowiednio 0,16 i 0,33  $\mu$ M, silniejszymi niż kwas elagowy ( $IC_{50}$  1,1  $\mu$ M) i witamina C ( $IC_{50}$  1,9  $\mu$ M). Urolityna A, pomimo że charakteryzowała się niższym potencjałem antyoksydacyjnym ( $IC_{50}$  13,6  $\mu$ M), to odpowiadała zakresowi stężeń osiąganymi *in vivo*, podczas gdy urolityna B nie wykazywała aktywności antyoksydacyjnej. Zaletą testów antyoksydacyjnych przeprowadzonych na komórkach, w przeciwieństwie do testów enzymatycznych, jest uwzględnienie transportu przez błony i możliwość oceny biodostępności badanych związków (31).

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów sugerują, że urolityny charakteryzują się wyższym potencjałem antyoksydacyjnym niż początkowo sądzono, przy czym obserwuje się dużą zmienność wyników w zależności od zastosowanej metody badawczej, co wymaga dalszych badań w warunkach *in vivo* (32).

### Aktywność przeciwzapalna

Aktywność przeciwzapalną urolityn potwierdzono w badaniach na liniach ludzkich fibroblastów okrężnicy, stymulowanych prozapalnie IL-1 $\beta$  lub TNF- $\alpha$  (33, 34). Komórki hodowano w obecności urolityny A, B, kwasu elagowego (33, 34) bądź mieszaniny wszystkich trzech metabolitów (34). Urolityny A i B wykazywały aktywność przeciwzapalną, charakteryzującą się spadkiem adhezji monocytów i ekspresji czynników, takich jak PGE<sub>2</sub>, PAI-1 (inhibitor aktywatora plazminogenu 1) oraz IL-8 (33). Mechanizm działania obydwu związków obejmuje zdolność hamowania translokacji jądrowej czynnika NF- $\kappa$ B i szlaków metabolicznych kinaz, aktywowanych miogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase* – MAPK), poprzez oddziaływanie na białka p38 (Uro A i B) i c-Jun (Uro A). Dodatkowym efektem urolityny A było hamowanie enzymów odpowiedzialnych za syntezę prostaglandyn w warunkach zapalenia – mPGES-1 (ang. *membrane-associated PGE synthase-1*) i COX-2 (34). W innym badaniu, glukuronidy Uro A i B (główne metabolity obecne w osoczu) oddziaływały przeciwzapalnie na stymulowane TNF- $\alpha$  ludzkie komórki śródbłonna aorty, regulując poziomy szeregu markerów związanych z procesem miażdżycowym, takich jak chemoattractant białko makrofagów MCP-1 (ang. *monocyte chemoattractant protein 1*) i PAI-1 (35).

Oprócz działania przeciwzapalnego, wobec fibroblastów i komórek śródbłonna (33-35), urolityny A, B

i C modulowały odpowiedź zapalną makrofagów oraz neutrofilii (35-37). W mysich makrofagach RAW 264,7 indukowanych LPS (lipopolisacharyd), obserwowano w obecności urolityn A-C hamowanie ekspresji iNOS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oraz IL-6 (35). Podobnie, w indukowanych prozapalnie makrofagach pochodzących z ludzkiej linii komórek białaczki THP-1, w wyniku inkubacji z urolitynami A-C odnotowano spadek produkcji TNF- $\alpha$ , przy czym Uro C była jedyną urolityną wykazującą zdolność hamowania produkcji IL-6 (36). W przypadku neutrofilii, urolityny A, B i C charakteryzowały się zróżnicowanym wpływem na modulatory zapalenia, obejmującym hamowanie IL-8 (Uro B), elastazy (Uro C) oraz hamowanie uwalniania mieloperoksydazy z ziarnistości granulocytów (Uro A, C) (37). W przypadku wszystkich analizowanych leukocytów najsilniejszy efekt przeciwzapalny wykazywała urolityna A (35-37).

Innym kierunkiem aktywności urolityn A i B jest hamowanie aktywności acetylotransferaz histonów (ang. *histone acetyltransferases* – HAT) w 40-50% w stężeniu 5  $\mu$ M. HAT pełnią rolę koaktywatorów transkrypcji czynników transkrypcyjnych, biorących udział w indukcji procesów zapalnych, takich jak NF- $\kappa$ B i AP-1 (38).

Aktywność przeciwzapalną urolityn w warunkach *in vivo* badano na szczurzym modelu wrzodziejącego zapalenia okrężnicy wywołanego dietą z dodatkiem 5% roztworu siarczanu dekstranu sodu (DSS). Początkowo, szczury szczepu Fisher otrzymywały tylko urolitynę A w dawce 15 mg/kg dziennie przez 20 dni. Następnie przez 5 kolejnych dni kontynuowano podawanie Uro A w tej samej dawce z jednoczesnym dodatkiem w diecie 5% DSS. Wykazano, że urolityna A obniżała poziom markerów zapalnych, takich jak iNOS, COX-2, PGE<sub>2</sub> oraz enzymu – syntazy prostaglandynowej PTGES (ang. *prostaglandin E synthase*).

Ponieważ zapaleniu jelita grubego towarzyszy hamowanie metabolizmu elagotanin, to potencjalnym lekiem przeciwzapalnym powinny być pojedyncze urolityny (29).

#### Aktywność chemoprewencyjna

Gruczoł krokowy stanowi jeden z organów, w którym potwierdzono obecność urolityn u ludzi (21), dlatego w jego tkankach jako pierwszych oceniano wpływ urolityn na proces nowotworzenia (39-43).

Urolityna A hamowała wzrost oraz wykazywała aktywność proapoptotyczną wobec dwóch linii komórkowych raka prostaty, DU-145 i PC-3, poprzez hamowanie cyklu komórkowego w fazie G<sub>2</sub>/M (39). Oceniano też wpływ urolityn na szereg markerów stanowiących potencjalne cele w chemoprewencji nowotworów prostaty, takich jak monoooksygenazy CYP1A1

i CYP1B1 z rodziny cytochromów P450 (CYP) (40), receptor androgenowy (ang. *androgen receptor* – AR), swoisty antygen sterczowy (ang. *prostate specific antigen* – PSA) (41) oraz receptory dla eferyn (ang. *erythropoietin-producing human hepatocellular receptors* – Eph) (42).

Aktywność katalityczną CYP1A1 i CYP1B1 oceniano w modelu badającym stopień dealkylacji O-deetylazy etoksyrezorufiny (ang. *ethoxyresorufin-O-deethylase* – EROD) w komórkach prostaty inkubowanych w obecności urolityn. Analizowane urolityny (A-D) hamowały aktywność CYP1B1, gdzie wartości IC<sub>50</sub> wynosiły od 1,15  $\mu$ M dla urolityny A do 137  $\mu$ M dla urolityny D, natomiast w przypadku CYP1A1 wartości IC<sub>50</sub> wynosiły odpowiednio 1,4 i 2907  $\mu$ M. Ponadto urolityny okazały się inhibitorami ekspresji genu *CYP1B1* (40). Hamowanie ekspresji przez urolityny A i B odnotowano również wobec AR i PSA w komórkach raka gruczołu krokowego linii LNCaP. Efekt ten był połączony z obniżeniem stężenia białka antyapoptotycznego Bcl-2 i indukcją apoptozy (41). W innym badaniu na linii LNCaP, w wyniku aktywacji kontrolujących ją kaspaz 3 i 7 stwierdzono indukcję apoptozy przez urolitynę A. Dodatkowo odnotowano zwiększoną ekspresję *CDKN1A*, który jest genem promotorowym białka supresorowego p16 (43). Uro C i D, jakkolwiek uważane za urolityny o najsłabszym działaniu chemoprewencyjnym wobec nowotworu prostaty, jako jedyne wykazały powinowactwo do receptorów Eph, będąc konkurencyjnymi dla promujących angiogenezę nowotworową ligandów (eferyn) (42).

Wiele badań wskazuje na właściwości chemoprewencyjne urolityn w zapobieganiu nowotworom jelita grubego, gdzie są wytwarzane w stężeniach umożliwiającym osiągnięcie efektu biologicznego (3, 4, 28, 44-48).

Efekt chemoprewencyjny urolityn oceniono na szeregu ludzkich linii komórkowych raka jelita grubego: Caco-2, SW480 i HT-29 (3, 4, 45, 46). Urolityny A-D, zależnie od dawki, hamowały proliferację wymienionych trzech linii poprzez hamowanie cyklu komórkowego w fazie S lub G<sub>2</sub>/M (3, 28, 45). Efektywność hamująca urolityn zmniejszała się w kolejności: Uro A > Uro C > Uro D > Uro B (45). Hamowanie cyklu w fazie S i G<sub>2</sub>/M w komórkach Caco-2 powodowała mieszanina urolityn A i B oraz kwasu elagowego poprzez modulację ekspresji szeregu genów regulujących cykl komórkowy, genów supresorowych, onkogenów oraz genów receptorów czynników wzrostu powiązanych ze szlakami metabolicznymi kinaz MAPK (4). Urolityny A-D działały proapoptotycznie na komórki Caco-2 (28) i HT-29 (3, 46), przy czym wykazano, że Uro A i B wpływają na wzrost ekspresji i aktywację białek regulujących apoptozę, takich jak p21, oraz

kaspazy 3, 8 i 9 (3). Ponadto urolityny A-D w stężeniu indukującym apoptozę hamowały w 50% aktywność enzymów CYP1 (46). W komórkach linii SW480 i HT-29 obserwowano całkowitą glukuronidację urolityn A i B po 48 godz. inkubacji, co ograniczało ich aktywność hamującą. Autorzy sugerują, że glukuronidacja urolityn zachodzi z udziałem błonowych transporterów ABC (ang. *ATP-binding cassette transporters*), uznawanych za receptory uczestniczące w ochronie komórek rakowych przed ksenobiotykami (45). W innym badaniu na linii HEK T293 wykazano, że urolityna A hamowała sygnalizację szlaku Wnt (jeden ze szlaków odgrywających kluczową rolę w karcynogenezie jelita grubego) i jej efektywność była ok. dwukrotnie wyższa niż kwasu elagowego (47).

Aktywność antyproliferacyjną urolityny A oceniono wobec izo-Uro A, na linii Caco-2 oraz zdrowych komórkach linii CCD18-Co. Zależny od dawki efekt antyproliferacyjny obserwowano dla obydwu związków, chociaż był on silniejszy wobec linii Caco 2, a aktywność iso-Uro A była wyraźnie słabsza. W trakcie trwania eksperymentu, w komórkach linii Caco-2 wykazano glukuronidację ok. 20% Uro A oraz ok. 50% iso-Uro A. Glukuronidy Uro A i iso-Uro A nie wykazywały aktywności hamującej wzrost komórek, co znacząco ograniczało ogólny efekt antyproliferacyjny (28). Urolityna A uwrażliwiała również komórki linii Caco-2, SW480 i HT-29 na działanie leku przeciwnowotworowego fluorouracylu (5-FU) (48).

Ponieważ urolityny i ich metabolity są obecne w płęcherzu moczowym i wydalane z moczem, ich aktywność antyproliferacyjną badano wobec linii T24 ludzkich komórek raka płęcherza moczowego. Urolityny A, B oraz kwas elagowy i metylo-Uro A hamowały proliferację w zbliżonym zakresie stężeń  $IC_{50}$  (33,7-46,3  $\mu$ M) w wyniku aktywacji kontrolującej apoptozę kaspazy 3 i ograniczania efektów stresu oksydacyjnego w komórkach płęcherza moczowego (49).

Oceniono wpływ urolityn na indukowaną testosteronem proliferację komórek raka piersi MCF-7 oraz powiązanego z nią enzymu – aromatazy, umożliwiającej konwersję androgenów w estrogeny i stanowiącej jeden z kluczowych czynników promujących rozwój raka piersi. Stwierdzono, że spośród 10 metabolitów kwasu elagowego, obejmujących urolitynę A, B oraz ich acetylowane, etylowane i sulfonowane pochodne, urolityna B jest najefektywniejszym inhibitorem zarówno proliferacji komórek rakowych, jak i enzymu aromatazy (50). W innym badaniu, obiektem chemoprewencyjnej aktywności urolityn było, należące do transporterów ABC, białko oporności raka piersi BCRP/ABCG2 warunkujące wielolekową oporność komórek nowotworowych. Spośród

analizowanych urolityn A-D oraz ich metabolitów: siarczanu Uro A, glukuronidu Uro A i glukuronidu Uro B, jedynie urolityna A oraz jej siarczan wykazały powinowactwo do BCRP, ograniczając jego aktywność w transportowaniu mitoksantronu w komórkach linii MDCKII (51).

W badaniu aktywności antyproliferacyjnej urolityny A wobec komórek linii HepG2 nowotworu wątroby, Uro A hamowała ekspresję NF- $\kappa$ B,  $\beta$ -kateniny, proto-onkogenu c-Myc, ograniczała poziom cykliny D1 oraz zwiększała ekspresję p38, p58 i kaspazy 3. Obok działania antyproliferacyjnego, obserwowano efekt antyoksydacyjny związany z redukcją komórkowych ROS (52).

### **Modulacja receptora estrogenowego**

Fitoestrogeny, w wyniku podobieństwa w budowie do estrogenów, mogą normalizować ich poziomy w organizmie, działając estrogenowo bądź antyestrogenowo. Z działaniem fitoestrogenów wiąże się wiele korzyści zdrowotnych, jak regulacja poziomu cholesterolu oraz utrzymanie gęstości mineralnej i wytrzymałości mechanicznej kości (53). Urolityny A i B badano na linii komórkowej MCF-7 pod kątem ich efektywności jako modulatorów estrogenowych. Obydwie urolityny wykazywały powinowactwo do receptorów ER $\alpha$  i ER $\beta$ , przy czym silniejsze było powinowactwo urolityny A do ER $\alpha$ . Urolityny działały estrogenowo, promując przeżycie komórek MCF-7, nawet w wysokim stężeniu, oraz antyestrogenowo w obecności promującego ich przeżycie 17- $\beta$ -estradiolu, co jest mechanizmem zbliżonym do obserwowanego dla innych znanych fitoestrogenów (resweratrolu, genisteiny, daidzeiny oraz enterolaktonu) (54).

### **Oddziaływanie na mikroflorę jelitową**

Informacje o wpływie urolityn na drobnoustroje są nieliczne (55, 56). Stwierdzono, że wytwarzanie urolityny A w jelicie grubym związane jest ze zróżnicowaniem składu mikroflory jelitowej, do której należy szereg bakterii z typów *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* oraz *Actinobacteria* (ryc. 5) (55).

Do interesujących wyników badań zalicza się określenie wpływu urolityn na system komunikacji bakteryjnej zwany *quorum sensing* (sygnalizator zagęszczenia) (56). *Quorum sensing* jest mechanizmem uczestniczącym w regulacji ekspresji genów drobnoustrojów, w odpowiedzi na gęstość populacji, przy udziale cząsteczek sygnalizacyjnych, zwanych autoinduktorami. Przekroczenie progowego stężenia autoinduktorów, sygnalizującego osiągnięcie odpowiedniej liczebności populacji, skutkuje skoordynowaną ekspresją genów, umożliwiającą bakteriom zapoczątkowanie szeregu

Typ	Rodzaj	Liczebność
Firmicutes	<i>Butyrivibrio</i>	↑
	<i>Lactobacillus</i>	↑
	<i>Veillonella</i>	↑
Bacteroidetes	<i>Prevotella</i>	↑
Proteobacteria	<i>Enterobacter</i>	↑
	<i>Escherichia</i>	↑
	<i>Serratia</i>	↑
Verrucomicrobia	<i>Akkermansia</i>	↑
Actinobacteria	<i>Collinsella</i>	↓

Ryc. 5. Wpływ Uro A na liczebność poszczególnych rodzajów bakterii mikroflory jelit (wzrost ↑, spadek ↓) (55)

procesów fizjologicznych prowadzących m.in. do rozwoju infekcji czy formowania, charakteryzującego się wysokim stopniem antybiotykooporności biofilmu (57).

Dotychczas jedyną informacją o oddziaływaniu urolityn na *quorum sensing* są dane o zdolności urolityn A i B do redukcji biofilmu oraz ruchliwości patogenu jelitowego *Yersinia enterocolitica*. Efekt ten był związany ze znacznym obniżeniem poziomów autoinduktora, laktonu N-acylo-L-homoseryny (ang. *acyl-L-homoserine lactone* – AHL) i redukcją ekspresji genów związanych z syntezą laktonów (*yenI* i *yenR*) oraz syntezą wici (*flhDC*, *fliA* i *fleB*) (56).

### Aktywność urolityn w profilaktyce chorób cywilizacyjnych – choroby demencyjne i zespół metaboliczny

#### Hamowanie powstawania zaawansowanych produktów glikacji (AGE)

Zaawansowane produkty glikacji (ang. *advanced glycation end-products* – AGE) są wynikiem nieprawidłowej glikacji białek bądź tłuszczów, będącej często wynikiem utrzymującej się hiperglikemii, i są łączone z rozwojem angiopatii naczyniowych w cukrzycy oraz w chorobie Alzheimera. W modelu eksperymentalnym białka surowiczej albuminy wołowej (ang. *bovine serum albumin* – BSA) inkubowanego z glukozą udowodniono, że zarówno urolityna A, jak i B w dawce 1  $\mu\text{mol/l}$  wykazują znaczące działanie hamujące powstawanie AGE, natomiast zależne od dawki zwiększenie efektu anty-AGE obserwowano tylko w przypadku urolityny A (58).

#### Działanie przeciwiglikemiczne

Urolityny, w obecności wysokich stężeń glukozy, charakteryzowały się zdolnością do modulacji mediatorów prozapalnych i czynników wzrostu w komórkach mięśniowych serca (kardiomiocytach) i fibroblastach. W stężeniu 1  $\mu\text{M}$  urolityna B i jej glukuronid były najbardziej efektywne w kardiomiocytach, natomiast urolityna D w odniesieniu do fibroblastów. Ograniczanie przez urolityny procesów zapalnych, będących wynikiem hiperglikemii, może mieć znaczenie w prewencji powikłania cukrzycowego, jakim jest kardiomiopatia (59).

#### Wpływ na adipogenezę i lipogenezę

Wpływ urolityn A-D oraz iso-Uro A na procesy adipogenezy oraz lipogenezy badano w ludzkich adipocytach oraz hepatocytach linii Huh7 ludzkiego nowotworu wątroby. Wykazano, że urolityny A, C i D w stężeniu 30  $\mu\text{M}$  znacząco hamowały powstawanie nowych adipocytów, co było związane z hamowaniem akumulacji triglicerydów, zwiększoną oksydacją kwasów tłuszczowych oraz zwiększoną fosforylacją (i przez to aktywacją) kinazy białkowej, aktywowanej przez adenozyonomonofosforan (AMPK). Aktywacja AMPK prowadzi do zahamowania szlaków anabolicznych (w tym syntezy tłuszczów) na korzyść procesów katabolicznych, w wyniku których powstaje ATP (60).

#### Aktywność neuroprotekcyjna

Produkcja  $\beta$ -amyloidu oraz fibrylizujących nieaktywnych białek, gromadzących się w mózgu w postaci złożeń, jest m.in. wyznacznikiem choroby Alzheimera.

W analizie 21 związków wyizolowanych z ekstraktu z owoców granatu (*Punica granatum*), w tym elagotanin, kwasu elagowego, jak również urolityn i ich pochodnych, stwierdzono, że urolityny A-D oraz metylo-urolityna B przeciwdziałały fibrylacji  $\beta$ -amyloidu w warunkach *in vitro*. Podobnie w modelu wykorzystującym nicienia *Caenorhabditis elegans* wykazano protekcyjne działanie urolityn, ograniczające neurotoksyczność i paraliż, indukowane amyloidem  $\beta$ 1-42. Ponadto, badania obliczeniowe *in silico*, przewidujące poziom przechodzenia badanych związków przez barierę krew-mózg wykazały, że tylko urolityny spełniają kryteria penetracji i są wchłaniane przez mózg (61).

W innych badaniach wykazano promowanie przez urolityny A i B przeżycia komórek nerwowych w warunkach stresu oksydacyjnego, indukowanego TNF- $\alpha$  (58).

## Piśmiennictwo

- Cerdá B, Periago P, Espín JC i wsp. Identification of urolithin A as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds. *J Agric Food Chem* 2005; 53:5571-6.
- Puupponen-Pimiä R, Seppänen-Laakso T, Kankainen M i wsp. Effects of ellagitannin-rich berries on blood lipids, gut microbiota, and urolithin production in human subjects with symptoms of metabolic syndrome. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57:2258-63.
- Cho H, Jung H, Lee H i wsp. Chemopreventive activity of ellagitannins and their derivatives from black raspberry seeds on HT-29 colon cancer cells. *Food Funct* 2015; 6:1675-83.
- González-Sarrías A, Espín JC, Tomás-Barberán FA i wsp. Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53:686-98.
- Wyzgoski FJ, Liladhar P, Rinaldi PL i wsp. Modeling relationships among active components in black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) fruit extracts using high-resolution 1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and multivariate statistical analysis. *J Agric Food Chem* 2010; 58:3407-14.
- Kim LS, Youn SH, Kim JY. Comparative study on antioxidant effects of extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2014; 43:1357-62.
- Ożarowski A, Jaroniewski W. Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie. Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych, Warszawa 1987.
- Kalt W, Forney CF, Martin A i wsp. Antioxidant capacity, vitamin C, and anthocyanins after storage of small fruits. *J Agric Food Chem* 1999; 47:4638-44.
- Bialonska D, Ramnani P, Kasimsetty SG i wsp. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *Int J Food Microbiol* 2010; 140:175-82.
- Lipińska L, Klewicka E, Sójka M. Structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. *Acta Sci Pol* 2014; 13:289-99.
- Majdan M. Badania składu chemicznego *Rubus idaeus* i *Rubus occidentalis* z uwzględnieniem aktywności farmakologicznej. Katedra i Zakład Farmakognozji, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk 2013.
- Cerdá B, Llorach R, Cerón JJ i wsp. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur J Nutr* 2003; 42:18-28.
- Cerdá B, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: Identification of biomarkers and individual variability. *J Agric Food Chem* 2005; 53:227-35.
- Cerdá B, Espín JC, Perra S i wsp. The potent *in vitro* antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur J Nutr* 2004; 43:205-20.
- González-Barrio R, Edwards CA, Crozier A. Colonic catabolism of ellagitannins, ellagic acid, and raspberry anthocyanins: *in vivo* and *in vitro* studies. *Drug Metab Dispos* 2011; 39:1680-8.
- Landete JM. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Res Int* 2011; 44:1150-60.
- Mena P, Bruni R, Calani L i wsp. Chapter 6 – Bioactivation of high-molecular-weight polyphenols by the gut microbiome, in diet-microbe interactions in the gut. Academic Press, San Diego 2015; 73-101.
- Zhou BH, Jin L, Tu J i wsp. Metabolites of tannins in *Punica granatum* L. husk in rat urine. *J Chinese Pharm Sci* 2014; 49:821-4.
- Espín JC, González-Barrio R, Cerdá B. Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *J Agric Food Chem* 2007; 55:10476-85.
- Seeram NP, Aronson WJ, Zhang Y i wsp. Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland. *J Agric Food Chem* 2007; 55:7732-7.
- González-Sarrías A, Giménez-Bastida JA, García-Conesa MT. Occurrence of urolithins, gut microbiota ellagic acid metabolites and proliferation markers expression response in the human prostate gland upon consumption of walnuts and pomegranate juice. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54:311-22.
- Tulipani S, Urpi-Sarda M, García-Villalba R i wsp. Urolithins are the main urinary microbial-derived phenolic metabolites discriminating a moderate consumption of nuts in free-living subjects with diagnosed metabolic syndrome. *J Agric Food Chem* 2012; 60:8930-40.
- Truchado P, Larossa M, García-Conesa MT i wsp. Strawberry processing does not affect the production and urinary excretion of acid metabolites, in humans. *J Agric Food Chem* 2012; 60:5749-54.
- Mertens-Talcott SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J i wsp. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *J Agric Food Chem* 2006; 54:8956-61.
- García-Muñoz C, Hernández L, Pérez A i wsp. Diversity of urinary excretion patterns of main ellagitannins' colonic metabolites after ingestion of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*) juice. *Food Res Int* 2014; 55:161-9.
- Selma MV, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *J Agric Food Chem* 2009; 57:6485-501.
- Tomás-Barberán FA, García-Villalba R, González-Sarrías A i wsp. Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: Consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status. *J Agric Food Chem* 2014; 62:6535-8.
- González-Sarrías A, Núñez-Sánchez MA, García-Villalba R i wsp. Antiproliferative activity of the ellagic acid-derived gut microbiota isourolithin A and comparison with its urolithin A isomer: the role of cell metabolism. *Eur J Nutr* 2015; 1-11.
- Larrosa M, González-Sarrías A, Yáñez-Gascón MJ i wsp. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nutr Biochem* 2010; 21:717-25.
- Ishimoto H, Tai A, Yoshimura M. Antioxidative properties of functional polyphenols and their metabolites assessed by an ORAC assay. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76:395-9.
- Dobroslawa B, Kasimsetty SG, Khan SI i wsp. Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *J Agric Food Chem* 2009; 57:10181-6.
- Kallio T, Kallio J, Jaakkola M i wsp. Urolithins display both antioxidant and pro-oxidant activities depending on assay system and conditions. *J Agric Food Chem* 2013; 61:10720-9.
- Giménez-Bastida JA, Larossa M, González-Sarrías A i wsp. Intestinal ellagitannin metabolites ameliorate cytokine-induced inflammation and associated molecular markers in human colon fibroblasts. *J Agric Food Chem* 2012; 60:8866-76.



34. González-Sarriás A, Larossa M, Tomás-Barberán FA i wsp. NF- $\kappa$ B-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts. *Br J Nutr* 2010; 104:503-12.
35. Piwowarski JP, Kiss AK, Granica S i wsp. Urolithins, gut microbiota-derived metabolites of ellagitannins, inhibit LPS-induced inflammation in RAW 264.7 murine macrophages. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59(11):2168-77.
36. Piwowarski JP, Granica S, Zwierzyńska M i wsp. Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. *J Ethnopharmacol* 2014; 155:801-9.
37. Piwowarski JP, Granica S, Kiss AK. Influence of gut microbiota-derived ellagitannins metabolites urolithins on pro-inflammatory activities of human neutrophils. *Planta Med* 2014; 80:887-95.
38. Kiss AK, Granica S, Stolarczyk M i wsp. Epigenetic modulation of mechanisms involved in inflammation: Influence of selected polyphenolic substances on histone acetylation state. *Food Chem* 2012; 131:1015-20.
39. Vicinanza R, Zhang Y, Henning SM i wsp. Pomegranate juice metabolites, ellagic acid and urolithin a, synergistically inhibit androgen-independent prostate cancer cell growth via distinct effects on cell cycle control and apoptosis. *Evid Based Complem Altern Med* 2013.
40. Kasimsetty SG, Bialonska D, Reddy MK i wsp. Effects of pomegranate chemical constituents/intestinal microbial metabolites on CYP1B1 in 22Rv1 prostate cancer cells. *J Agric Food Chem* 2009; 57:10636-44.
41. Sánchez-González C, Ciudad CJ, Noé V i wsp. Walnut polyphenol metabolites, urolithins A and B, inhibit the expression of the prostate-specific antigen and the androgen receptor in prostate cancer cells. *Food and Funct* 2014; 5:2922-30.
42. Giorgio C, Mena P, Del Rio D i wsp. The ellagitannin colonic metabolite urolithin D selectively inhibits EphA2 phosphorylation in prostate cancer cells. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59(11):2155-67.
43. Sánchez-González C, Ciudad CJ, Izquierdo-Pulido M i wsp. Urolithin A causes p21 up-regulation in prostate cancer cells. *Eur J Nutr*, 2016; 55:1099-112.
44. Nuñez-Sánchez MA, García-Villalba R, Monedero-Saiz T i wsp. Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. *Mol Nutr Food Res* 2014; 58:1199-211.
45. González-Sarriás A, Giménez-Bastida JA, Nuñez-Sánchez MA i wsp. Phase-II metabolism limits the antiproliferative activity of urolithins in human colon cancer cells. *Eur J Nutr* 2014; 53:853-64.
46. Kasimsetty SG, Bialonska D, Reddy MK i wsp. Colon cancer chemopreventive activities of pomegranate ellagitannins and Urolithins. *J Agric Food Chem* 2010; 58(4):2180-7.
47. Sharma M, Li L, Celver J i wsp. Effects of fruit ellagitannin extracts, ellagic acid, and their colonic metabolite, urolithin A, on Wnt signaling. *J Agric Food Chem* 2010; 58:3965-9.
48. González-Sarriás A, Tomé-Carneiro J, Ballester A i wsp. The ellagic acid-derived gut microbiota metabolite, urolithin A, potentiates the anticancer effects of 5-fluorouracil chemotherapy on human colon cancer cells. *Food and Funct* 2015; 6:1460-9.
49. Qiu Z, Zhou B, Jin L i wsp. *In vitro* antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells. *Food Chem Toxicol* 2013; 59:428-37.
50. Adams LS, Zhang Y, Seeram NP i wsp. Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells *in vitro*. *Cancer Prev Res* 2010; 3:108-13.
51. González-Sarriás A, Miguel V, Merino G i wsp. The gut microbiota ellagic acid-derived metabolite urolithin a and its sulfate conjugate are substrates for the drug efflux transporter breast cancer resistance protein (ABCG2/BCRP). *J Agric Food Chem* 2013; 61:4352-9.
52. Wang Y, Qiu Z, Zhou B i wsp. *In vitro* antiproliferative and antioxidant effects of urolithin A, the colonic metabolite of ellagic acid, on hepatocellular carcinomas HepG2 cells. *Toxicol in Vitro* 2015; 29:1107-15.
53. Espín JC, Larrosa M, García-Conesa MT. Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: The evidence so far. *Evid Based Complem Altern Med* 2013.
54. Larrosa M, González-Sarriás A, García-Conesa MT i wsp. Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. *J Agric Food Chem* 2006; 54:1611-20.
55. Li Z, Henning SM, Lee RP i wsp. Pomegranate extract induces ellagitannin metabolite formation and changes stool microbiota in healthy volunteers. *Food Funct* 2015; 6:2487-95.
56. Giménez-Bastida JA, Truchado P, Larrosa M i wsp. Urolithins, ellagitannin metabolites produced by colon microbiota, inhibit Quorum Sensing in *Yersinia enterocolitica*: Phenotypic response and associated molecular changes. *Food Chem* 2012; 132:1465-74.
57. Myszka K, Czaczyk K. Mechanizm quorum sensing jako czynnik regulujący wirulencję bakterii Gram-ujemnych. *Postępy Hig Med Dośw* 2010; 64:582-9.
58. Verzelloni E, Pellacani C, Tgliacuzzi i wsp. Antigliative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol catabolites. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55:S35-S43.
59. Sala R, Mena P, Savi M i wsp. Urolithins at physiological concentrations affect the levels of pro-inflammatory cytokines and growth factor in cultured cardiac cells in hyperglycemic conditions. *J Funct Foods* 2015; 15:97-105.
60. Kang I, Kim Y, Tomás-Barberán FA. Urolithin A, C, and D, but not iso-urolithin A and urolithin B, attenuate triglyceride accumulation in human cultures of adipocytes and hepatocytes. *Mol Nutr Food Res* 2016; 60(5):1129-38.
61. Yuan T, Ma H, Liu W i wsp. Pomegranate's neuroprotective effects against Alzheimer's disease are mediated by urolithins, its ellagitannin-gut microbial derived metabolites. *ACS Chem Neurosci* 2016; 7:26-33.

**Konflikt interesów****Conflict of interest**

Brak konfliktu interesów  
None

otrzymano/received: 10.08.2020

zaakceptowano/accepted: 18.12.2020

Adres/address:

\*prof. dr hab. n. farm. Mirosława Krauze-Baranowska  
Katedra i Zakład Farmakognozji  
Wydział Farmaceutyczny  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
al. gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk  
e-mail: mirosława.krauze-baranowska@gumed.edu.pl