



**UNIwersytet Medyczny**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**Właściwości antyglukacyjne ekstraktów roślinnych z rodzaju**  
*Reynoutria*

**Antiglication properties of plant extracts from the genus**  
*Reynoutria*

**Streszczenie rozprawy doktorskiej**  
Arleta Dołowacka-Józwiak

**Promotorzy**  
Prof. dr hab. Jakub Gburek  
Dr Krzysztof Gołąb

**Katedra Biochemii Farmaceutycznej**  
Wydziału Farmaceutycznego

**Wrocław 2022**

Globalna częstość występowania cukrzycy na świecie stale rośnie. W 2021 r. zanotowano około 537 milionów przypadków dorosłych (w przedziale wiekowym 20–80 lat) żyło z cukrzycą. Szacuje się, że do 2030 r. całkowita liczba osób chorych na cukrzycę wzrośnie do 643 mln, a w 2045 r. będzie to już 783 mln. Zapadalność na cukrzycę jest wyższa w krajach o wysokich dochodach (10,4%) niż w krajach o dochodach niskich (4%) [**Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.**]. Niekontrolowana cukrzyca wiąże się z powikłaniami i z innymi chorobami takimi jak miażdżyca czy choroba Alzheimera. Długotrwała hiperglikemia prowadzi do wielu zaburzeń metabolicznych oraz biochemicznych, przyczyniając się do przyspieszonego procesu glikacji białek i rozwoju powikłań naczyniowych mikro- i makroangiopatii. Reakcja Maillarda jest przemianą biochemiczną, polegającą na nieenzymatycznej glikacji białek, na skutek czego następuje ich modyfikacja i utrata pierwotnej roli w organizmie oraz do powstawania końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGEs, *Advanced Glycation End Products*). W odniesieniu do roli produktów AGEs w patogenezie powikłań cukrzycowych oraz innych chorób stwierdza się, że związki wykazujące aktywność antyglykacyjną mogą wspomóc zmniejszenie skutków związanych z procesem glikacji. Obecnie poszukuje się związków naturalnych, które mogą mieć lepszą skuteczność hamowania procesu glikacji ze względu na mniejszą ilość efektów ubocznych w porównaniu do związków syntetycznych.

Od wielu wieków ekstrakty z roślin służyły człowiekowi w medycynie ludowej, a obecnie są produktem wyjściowym wielu farmaceutyków wykorzystywanych tak w profilaktyce, jak i w leczeniu różnych chorób. Obecnie prowadzi się wiele badań nad wpływem ekstraktów z roślin na zdrowie człowieka, na co wskazuje bogata literatura światowa. Istnieją liczne doniesienia na temat aktywności biologicznej ekstraktów roślin z rodzaju rdestowców: *Reynoutria japonica*, *Reynoutria sachalinensis* oraz rdestowca pośredniego *Reynoutria x bohemica*, jednak właściwości antyglykacyjne tych roślin nie były dotychczas badane.

W związku z powyższym celem pracy doktorskiej była ocena aktywności antyglykacyjnej wybranych ekstraktów roślin z rodziny rdestowatych *Reynoutria* (*Reynoutria x bohemica*, *Reynoutria sachalinensis* i *Reynoutria japonica*) w stosunku do albuminy wołowej (BSA, *Bovine Serum Albumin*) oraz albuminy surowicy krwi ludzkiej (HSA, *Human Serum Albumin*) w warunkach *in vitro*. Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej były podzielone na dwie części. W pierwszej kolejności optymalizowano model glikacji dla badanych ekstraktów, dobierając stężenia reagentów i parametry w warunkach *in vitro*. Natomiast druga część polegała na dokładnym przebadaniu potencjału antyglykacyjnego

ekstraktów na ostatecznym modelu eksperymentalnym glikacji. W niniejszej pracy doktorskiej podjęto cztery główne zadania badawcze:

1. Opracowanie modelu glikacji albuminy wołowej *in vitro* w różnych warunkach.
2. Ocena potencjału hamującego badanych ekstraktów w etapach powstawania produktów AGEs poprzez ich analizę na poszczególnych poziomach procesu glikacji.
3. Określenie siły działania antyglykacyjnego wybranych ekstraktów roślin z rodziny rdestowatych i porównanie ich z wybranymi wzorcami oraz lekiem przeciwcukrzycowym. Wyznaczenie krzywej hamowania ( $IC_{50}$ , *half maximal inhibitory concentration*).
4. Analiza elektroforetyczna w celu potwierdzenia hamowania powstawania AGEs.

W badaniach wykorzystano albuminę wołową oraz surowicy krwi ludzkiej. Struktura albuminy wołowej jest dobrze poznana, co pozwala na jej szerokie zastosowanie w eksperymentach naukowych jako białko modelowe w warunkach *in vitro*. W badaniu również wykorzystano albuminę surowicy krwi ludzkiej, by skonfrontować wyniki procesu glikacji z albuminą wołową. Jako wzorce związków antyglykacyjnych wykorzystano resweratrol, aminoguanidynę, witaminę C oraz metforminę. Resweratrol występuje w omawianych roślinach z rodzaju *Reynoutria*, dlatego został wybrany jako wskaźnik hamowania procesu glikacji. Drugim związkiem referencyjnym była aminoguanidyna jako dobrze przebadany związek pod kątem aktywności antyglykooksydacyjnej. Witamina C uznana jest za dobry antyoksydant, wykorzystano ją, aby móc porównać jej silne właściwości przeciwutleniające w procesie glikacji z przebadanymi ekstraktami. Podobna sytuacja dotyczy metforminy jako znanego leku przeciwcukrzycowego – zastosowano ją do porównania wyników hamowania produktów AGEs z wybranymi ekstraktami. W pracy przeprowadzono różne eksperymenty dotyczące reakcji glikacji białka, aby bliżej poznać proces i ustalić odpowiednie warunki.

Dokonano przeglądu najnowszej literatury w celu zweryfikowania aktualnego stanu wiedzy dotyczącego procesu glikacji białek i udziału surowców naturalnych w hamowaniu tego procesu.

Praca zawiera podstawowe informacje dotyczące budowy i funkcji albuminy wołowej i surowicy krwi ludzkiej. Przedstawiono również wiedzę na temat cukrzycy, procesu glikacji

oraz ich biologicznych następstw. W pracy zebrano najistotniejsze informacje na temat roślin z rodzaju *Reynoutria* oraz inhibitorów hamowania tworzenia produktów AGEs

Badania rozpoczęto od sprawdzenia wpływu czasu inkubacji i stężenia mieszaniny cukrów (glukozy i fruktozy) na glikację albuminy wołowej i surowicy krwi ludzkiej oraz procesu gliakcji na kontrolę ujemną (BSA lub HSA) i dodatnią (BSA lub HSA i mieszanina cukrów). Na bazie uzyskanych rezultatów oraz opierając się na dostępnej literaturze można przypuszczać, że inkubacja z cukrami wywołuje zmiany konformacyjne w cząsteczkach albuminy (BSA, HSA) w zależności od stężenia i czasu inkubacji. Widoczny był wzrost fluorescencji zarówno w przypadku pentozydyny, jak i wesperalizyny dla 7. oraz 14. dnia inkubacji. Wzrost do 14. dnia inkubacji może odzwierciedlać początkowy etap tworzenia produktów Amadori. Natomiast począwszy od 21. dnia wartości te nie rosły tak gwałtownie. Można przypuszczać, że nastąpił spadek ilości produktów Amadori, co mogło być wynikiem zakończenia etapu wczesnego i zainicjonowania etapu pośredniego. Duży wzrost obserwowano pomiędzy 28. a 35. dniem inkubacji; ten ponowny wzrost wartości fluorescencji mógł odpowiadać końcowemu etapowi reakcji Maillarda, w którym produkty glikowane ponownie reagują z wolnymi grupami aminowymi albumin BSA oraz HSA, prowadząc do powstania fluorescencyjnych, usieciowanych oraz nieodwracalnych produktów gliakcji. Eksperyment wykazał również, że albuminy w kontroli ujemnej są stabilne w różnych warunkach inkubacji (biorąc pod uwagę różne stężenia albuminy, czas inkubacji oraz temperaturę). Zauważalne zmiany były widoczne w kontroli dodatniej, gdzie czas inkubacji, stężenie albumin ma istotny wpływ na proces gliakcji. Wyniki pozwoliły na zaprojektowanie modelu procesu gliakcji w warunkach *in vitro*, który odtworzył rozwój reakcji Maillarda, tak aby móc sprawdzić nie tylko, który z badanych ekstraktów i frakcji hamuje powstawanie produktów AGEs, ale na jakim etapie badany ekstrakt działa.

Kolejnym etapem pracy było badanie przesiewowe właściwości antyglikacyjnych ekstraktów z liści i kłączy wobec albumin. Wstępne badania przesiewowe były przeprowadzone w temperaturze 50°C oraz podczas 4 dni inkubacji. Analizy pokazały, że większą aktywność wykazują ekstrakty pochodzące z kłączy niż liści z roślin z rodzaju *Reynoutria*. Powyższe doświadczenia pozwoliły na wyciągnięcie odpowiednich wniosków, dzięki którym przystąpiono do dalszych badań, czyli opracowania kolejnego testu z wybranymi ekstraktami i frakcjami, wykorzystując albuminę wołową oraz ludzką w temperaturze 37°C przez 28 dni. W pracy skupiono się przede wszystkim na opracowaniu dobrego modelu przesiewowego dla inhibitorów procesów gliakcji przy użyciu naturalnych ekstraktów roślinnych. W celu wykrycia postępu procesu gliakcji w krótkim czasie zastosowano nie tylko glukozę, ale również fruktozę,

której siła redukująca jest znacznie większa niż glukozy. Wykorzystano również albuminę wołową, która jest bardziej dostępnym odczynnikiem niż HSA, jest głównym białkiem krwi ssaków i niewiele różni się od albuminy ludzkiej. Dlatego też jest często wykorzystywana w badaniach wstępnych. Natomiast w dalszych, wybranych doświadczeniach zastosowano albuminę ludzką. Reakcja Maillarda z użyciem powyższych odczynników odzwierciedla model procesu glikacji w warunkach *in vivo*. Glukoza jest cukrem redukującym, głównym paliwem organizmu, a jej stężenie we krwi cukrzyków jest stale kontrolowane. Istnieją dowody, że spożywanie fruktozy w nadmiarze prowadzi do procesu glikooksydacji i wytwarzania reaktywnych form tlenu, co w konsekwencji powoduje uszkodzenie oksydacyjne i dysfunkcje komórkowe, które towarzyszą procesowi starzenia się organizmu. W warunkach hiperglikemii fruktoza może być syntetyzowana przez utlenianie sorbitolu w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę polioliową. Po porównaniu reaktywności glukozy i fruktozy z białkami w fizjologicznej temperaturze i jednakowym stężeniu okazało się, że szybsza akumulacja fluorescencji związanej z białkami oraz produktami sieciowania pochodziła właśnie z fruktozy. Ponadto w niektórych badaniach wykazano, że fruktoza szybciej niż glukoza przyczynia się do powstawania rodników hydroksylowych oraz związków dikarbonylowych. Hinton i wsp. **[Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.]** opublikowali wyniki badań dotyczących miejsc modyfikowanych przez glukozę oraz fruktozę w albuminie wołowej, wskazując na lizynę jako główne miejsce glikacji – 524 i 31 **[Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania., Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.]**. Reakcja modyfikowania albuminy przez fruktozę jest około 17-krotnie wydajniejsza niż przez glukozę. Proces glikacji indukowany fruktozą prowadzi do szybkiego utleniania albuminy i w konsekwencji zmienia strukturę białka, wpływając na jego funkcje biologiczne. Grupa tiolowa reszt Cys jest w szczególności podatna na stres oksydacyjny przez wolne rodniki, które uszkadzają białka poprzez tworzenie wiązań dwusiarczkowych zachodzących podczas agregacji białek, powodując utratę ich aktywności enzymatycznej. Bezpośrednie utlenianie lizyny, treoniny oraz argininy lub wtórna reakcja reszt histydyny i cysteiny z reaktywnymi związkami karbonylowymi mogą prowadzić do powstania różnych pochodnych karbonylowych. Przebieg reakcji Maillarda monitoruje się trzema metodami: 1) poprzez wykrywanie radioaktywnego włączenia  $^{14}\text{C}/^3\text{H}$  – glukozy do białka, 2) poprzez pomiar siły redukcyjnej produktów Amadori, 3) poprzez pomiar intensywności fluorescencji powstałych produktów AGEs. W niniejszej pracy zastosowano tę ostatnią technikę. Jest ona przydatna do znalezienia potencjalnych inhibitorów późniejszej fazy reakcji Maillarda. Zatem metoda, w której wykonuje się pomiary intensywności fluorescencji oparta na produktach AGEs, może służyć jako sposób znalezienia potencjalnego inhibitora

procesu glikacji na wszystkich jej etapach, czyli od wiązania cukru redukującego z albuminą do powstawania produktów AGEs.

W badaniach zastosowano warunki bliskie fizjologicznym: albuminę ludzką w stężeniu odpowiadającym stężeniu w osoczu, długość inkubacji liczącą kilka tygodni. Czas inkubacji jest bardzo ważny, ponieważ tempo powstawania produktów AGEs jest powolne w warunkach fizjologicznych. Inhibitory powstawania produktów AGEs, które są główną przyczyną powikłań cukrzycowych, powinny być wykrywane w największym stopniu w badaniach przesiewowych. Dlatego też opracowano odpowiedni system przesiewowy, który można nazwać metodą oceny aktywności działania inhibitorów procesu glikacji. Niestety minusem tego systemu jest długi czas inkubacji i powolna reakcja, czyli długi czas oczekiwania. Aby rozwiązać ten problem, można zastosować wyższą temperaturę. Jednak przy takiej metodzie wyłania się inna kwestia: stosując wyższą temperaturę i krótszy czas inhibicji, można napotkać na interferencje fluorescencji powstałe przez znajdujące się w naturalnych ekstraktach roślinnych substancje autofluorescencyjne oraz niektóre barwniki. Stosując wysoką temperaturę (ponad 40°C), Maatsura [Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.] stwierdził istotne zmiany konformacyjne albuminy wołowej, mianowicie częściowe przekształcenie struktury  $\alpha$  helikalnej w strukturę  $\beta$ . Jednak należy podkreślić, że naukowcy w badaniu zastosowali BSA o krystalicznej strukturze o wysokiej czystości, natomiast w pracy użyto frakcji V BSA, które mogą się różnić się zachowaniem stabilności struktury w zależności od temperatury. Dlatego w pracy opracowano system przesiewowy z wykorzystaniem wysokiej temperatury i krótkiego czasu inkubacji. Jak wcześniej wspomniano, w ekstraktach roślinnych znajduje się duża ilość substancji autofluorescencyjnych i barwiących, które mogą wpływać na wartości fluorescencji produktów AGEs. Intensywność fluorescencji tych substancji jest czasami tak wysoka, że w niektórych próbkach była ona większa ponad 10 razy niż w kontroli. Zatem trudno jest właściwie wykluczyć efekt wygaszania czy zmian koloru lub odbarwiania się pod wpływem reakcji, które zachodzą w badanych próbach. Aby pozbyć się tych substancji, w pracy zastosowano dializę. Jednak nie jest to do końca optymalne rozwiązanie, dlatego warto w przyszłości przeprowadzić dodatkowe badania przy użyciu innych metod, jak np. zastosowanie kwasu trójchlorooctowego (TCA), który może pomyślnie usunąć większe cząsteczki w danych próbach, dzięki czemu wytrąca się kompleks AGEs – albumina.

Następnym etapem badań było sprawdzenie wpływu wybranych ekstraktów i frakcji na powstawanie wczesnych i późnych produktów glikacji, wpływ ich na utlenianie albuminy indukowanego procesem glikacji oraz na agregację produktów  $\beta$ -amyloidu. Wyniki pokazały,

że *R. sachalinensis* najlepiej hamował powstawanie wczesnych i późnych produktów glikacji. *R. japonica* wykazał wysoką ochronę przed utlenieniem albumin oraz silne właściwości hamujące powstawanie  $\beta$ -amyloidu. Z kolei hybryda *R. x bohemica*, która charakteryzuje się najmniejszą zawartością związków polifenolowych od pozostałych rdestowców, wykazała również silne właściwości antyglykacyjne. Ponadto przedstawiono silną korelację ujemną pomiędzy grupami tiolowymi białka a  $\beta$ -amyloidem oznaczanym za pomocą odczynnika czerwieni Kongo. Oznaczenia z użyciem odczynnika tioflawiny T wykazały dobrą korelację z grupami karbonyłowymi, fruktozaminą oraz produktami AGEs, a produkty AGEs z fruktozaminą, grupami karbonyłowymi oraz z  $\beta$ -amyloidem oznaczanym za pomocą tioflawiny T.

Kolejnym krokiem było wyznaczenie krzywej hamowania i przeprowadzenie elektroforezy w warunkach denaturujących. W przypadku wyznaczenia  $IC_{50}$  zaobserwowano, że niektóre ekstrakty wykazały niższe wyniki dla  $IC_{50}$  w porównaniu z wybranymi wzorcami. Z kolei wyniki elektroforezy potwierdziły wyraźny spadek ruchliwości elektroforetycznej glikowanej albuminy BSA i HSA w porównaniu do prób zawierających glikowane albuminy z ekstraktami. Ponadto w pracy przedstawiono całkowity potencjał antyglykacyjny badanych ekstraktów, podsumowując w postaci Tab. 9. i 10. aktywność antyglykacyjna na różnych etapach procesu glikacji.

Reasumując, w rozprawie doktorskiej wykazano, że badane ekstrakty i frakcje z rodzaju *Reynoutria* wykazały znaczną aktywność antyglykacyjną. Największy stopień hamowania powstawania wczesnych i późnych produktów glikacji oraz  $\beta$ -amyloidu zauważono wśród frakcji o największej zawartości prostych flawan-3-oli, procyjanidyny o niskim stopniu polimeryzacji oraz disacharydowych estrów fenylopropanoidowych. Związki te dominują w gatunku *R. sachalinensis*. Natomiast największą aktywność ochronną albuminy przed procesem glikacji zaobserwowano dla ekstraktu *R. japonica* charakteryzujący się największą zawartością stilbenów, w tym resweratrolu. Zaskakujące wyniki zauważono dla ekstraktu *R. x bohemica*, który zawiera największą ilość polifenoli, a ich ochrona grup karbonylowych i tiolowych w albuminach w reakcji Maillarda była niższa niż w obecności ekstraktów z pozostałych gatunków. Natomiast w przypadku hamowania produktów glikacji wykazała bardzo dobrą aktywność. Niektóre frakcje wykazywały zbliżoną aktywność przeciwiglykacyjną do referencyjnego związków aminogunidyny oraz resweratrolu. W pracy doktorskiej wykazano, że różnice w składzie w profilu fitochemicznym badanych ekstraktów gatunków rodzicielskich i gatunku mieszanego sugerują różne mechanizmy aktywności antyglykacyjnej poszczególnych klas metabolitów w nich zawartych. Ponadto w niniejszej rozprawie doktorskiej

zaobserwowano, że istnieje zależność między średnim stopniem polimeryzacji procyjanidyn (mDP, *Mean Degree of Polymerization*) a aktywnością przeciwglikacyjną. Mimo że istnieje wiele doniesień na temat zależności pomiędzy wartością mDP procyjanidyn a ich aktywnością antyoksydacyjną, to mało jest badań naukowych dotyczących tych zależności mDP oraz o aktywności procyjanidyn o niskim stopniu polimeryzacji w procesie glikacji.

W pracy doktorskiej po raz pierwszy oceniono potencjał antyglikacyjny ekstraktów wyizolowanych z roślin rodzaju *Reynoutria*, a także opisano modyfikacje glikowanych BSA i HSA oraz dokładnie zaprojektowano model testu przesiewowego w procesie glikacji dla surowca naturalnego, uwzględniając wszystkie parametry i warunki tego procesu. W pracy doktorskiej uzyskano ważne informacje o roślinach z rodzaju rdestowatych, zwłaszcza o sposobie, w jaki hamują one glikację BSA i HSA, oraz o modyfikacjach oksydacyjnych i amyloidogennych. Zatem rezultaty wskazują, że ekstrakty różnych gatunków z rodzaju *Reynoutria* mogą być wykorzystane do zahamowania procesu glikacji na różnych jej etapach. Właściwości antyglikacyjne, ochrona albumin przed utlenieniem i hamowanie powstawanie  $\beta$ -amyloidu mogą chronić komórki przed skutkami spowodowanymi długotrwałym narażeniem glikemii i mogą potencjalnie zmniejszyć następstwa biologiczne spowodowane powikłaniami cukrzycowymi. Te podstawowe badania stwarzają podstawy do opracowania nowych preparatów roślinnych spowalniających procesy cukrzycowe.



## SUMMARY

The global prevalence of diabetes continues to rise. In 2021, approximately 537 million adults (aged 20-80) suffer from diabetes. It is estimated that the total number of diabetics will increase to 643 million by 2030 and 783 million by 2045. The prevalence of diabetes is higher in high-income countries (10.4%) compared to low-income countries (4%) [**Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.**]. Uncontrolled diabetes is associated with complications and other diseases such as atherosclerosis, Alzheimer's disease. Long-term hyperglycaemia causes many metabolic and biochemical abnormalities, including accelerated protein glycation and the development of vascular complications such as microangiopathy and macroangiopathy. The Maillard reaction is a biochemical change that leads to the non-enzymatic glycation of proteins, resulting in their modification and loss of their original role in the body and the formation of advanced glycation end products (AGEs). In terms of the role of AGEs in the pathogenesis of diabetic complications and other diseases, compounds exhibiting antiglycation activity may help to reduce the effects associated with glycation. Currently, natural compounds are being sought as a possible better option for inhibiting glycation due to fewer side effects compared to synthetic compounds.

For centuries, plant extracts have been used in folk medicine, and nowadays they are the starting material for many pharmaceuticals that are used both in prevention and treatment of various diseases. Currently, there are many studies in progress on the effects of plant extracts on human health, as indicated by the extensive world literature. There are numerous reports concerning the biological activities of extracts of *Reynoutria* (knotweed) species, i.e. *Reynoutria japonica*, *Reynoutria sachalinensis* and intermediate species of knotweed – *Reynoutria x bohemica*; however, antiglycation properties of these plants have not yet been studied.

Therefore, this doctoral thesis aims to evaluate the antiglycation activity of selected extracts of knotweed plants in the family Polygonaceae and the genus *Reynoutria* (*Reynoutria x bohemica*, *Reynoutria sachalinensis* and *Reynoutria japonica*) against bovine serum albumin (BSA) and human serum albumin (HSA) *in vitro*. The research conducted in this doctoral thesis was divided into two parts. Firstly, an appropriate model of glycation was optimised for the tested extracts by selecting reagent concentrations and parameters *in vitro*. The second part of this doctoral thesis focused on thorough testing of the antiglycation potential of the extract using a final model of glycation. Four main research tasks were undertaken in this dissertation:

1. To develop an in vitro model of bovine albumin glycation under different conditions.

2. To evaluate the inhibitory potential of the studied extracts in the stages of AGEs product formation by analyzing them at different levels of the glycation process.

3. to determine the potency of the antiglycation activity of selected extracts from plants of the knotweed family and to compare them with selected standards and an antidiabetic drug. Determination of inhibition curve (IC<sub>50</sub>, half maximal inhibitory concentration).

- 4 Electrophoretic analysis to confirm the inhibition of AGEs formation.

Beef albumin and human blood serum were used in this study. The structure of bovine albumin is well understood, allowing it to be widely used in scientific experiments as a model protein in vitro. Human serum albumin was also used in this study to contrast the results of glycation process with bovine albumin. Resveratrol, aminoguanidine, vitamin C, and metformin were used as models for antiglycation compounds. Resveratrol is found in the *Reynoutria* genus plants discussed above and was therefore chosen as an indicator of glycation inhibition. The second reference compound was aminoguanidine as a well-studied compound for antiglycoxidative activity. Vitamin C is recognized as a good antioxidant, it was used to be able to compare its strong antioxidant properties in the glycation process with the tested extracts. A similar situation applies to metformin as a known antidiabetic drug it was used to compare the results of inhibition of AGEs products with selected extracts. In this study, various experiments on protein gliaction reaction were carried out to know more about the process and to establish the appropriate conditions.

Recent literature was reviewed to check the state of the art regarding the process of protein glycation and the contribution of natural resources in inhibiting this process. This paper provides basic information concerning the structure and function of BSA and HSA.

This doctoral thesis also presents the knowledge of diabetes, glycation and their biological consequences. The most relevant information was collected on plants of the genus *Reynoutria* and inhibitors of AGEs formation.

The research began by examining the effects of incubation period and concentration of sugar mixture (glucose and fructose) on the glycation of bovine albumin and human albumin, and the effects of glycation process on a negative control (BSA or HSA) and a positive control (BSA or HSA and sugar mixture). Based on the results obtained and available literature, it can

be assumed that incubation with sugars induces conformational changes in albumin molecules (BSA, HSA) according to the concentration and incubation period. There was a noticeable increase in fluorescence for both pentosidine and vesperalysine on the 7th and 14th day of incubation. The increase until the 14th day of incubation may reflect the initial stage of Amadori product formation. On the other hand, starting from day 21., the values did not increase so rapidly. It can be assumed that there was a decrease in Amadori products, which may have been the result of the end of the early stage and the initiation of the intermediate stage. There was a large increase between the 28th and the 35th day of incubation; this re-increase in fluorescence values could correspond to the final stage of the Maillard reaction in which glycated products react again with free amino groups of BSA and HSA, leading to the formation of fluorescent, cross-linked and irreversible glycation products. The experiment also revealed that albumins used as a negative control are stable under different incubation conditions (according to different albumin concentrations, incubation period and temperature). Noticeable changes were found in the positive control, in which incubation period and albumin concentration have a significant effect on glycation. These findings allowed to design an *in vitro* model of the glycation process, which reconstructed the development of the Maillard reaction, so that it could be possible not only to verify which of the tested extracts and fractions inhibits AGEs formation, but also at which stage the tested extract is active. The next step of the research was the screening of antiglycation properties of leaf and rhizome extracts against albumins. Preliminary screening was performed at 50°C after four days of incubation. Analyses revealed that extracts from rhizomes of plants of the genus *Reynoutria* were more active than extracts from leaves of plants of the genus *Reynoutria*. The aforementioned experiments helped to draw appropriate conclusions, which allowed to proceed to further research, i.e., development of another test with selected extracts and fractions using bovine albumin and human albumin at 37°C for 28 days. The main focus of this study was to develop a good screening model for glycation inhibitors using natural plant extracts. Not only glucose but also fructose, which has a much higher reducing power than glucose, was used to detect the progress of glycation process in a short time. Bovine albumin, which is a more accessible reagent than HSA, was also used; it is a major mammalian blood protein and differs little from human albumin. Therefore, it is often used in preliminary studies. In contrast, human albumin was also used in further selected experiments. The Maillard reaction using the above reagents reflects an *in vivo* model of the glycation process. Glucose is a reducing sugar, the main fuel of the body, and its concentration in the blood of diabetics is constantly controlled. There is evidence that consumption of fructose in excess leads to the process of glycooxidation and production of reactive oxygen species,

resulting in oxidative damage and cellular dysfunction that accompany the aging process. Under hyperglycemic conditions, fructose can be synthesized by oxidation of sorbitol in a reaction catalyzed by polyol dehydrogenase. After comparing the reactivity of glucose and fructose with proteins at physiological temperature and equal concentration, it was found that the faster accumulation of fluorescence associated with proteins and cross-linking products was from fructose. In addition, some studies have shown that fructose contributes more rapidly than glucose to the formation of hydroxyl radicals and dicarbonyl compounds. Hinton et al [84] published results on sites modified by glucose and fructose in bovine albumin. Pointing to lysine as the main glycation site 524 and 31 [78, 79]. The reaction of modification of albumin by fructose is about 17 times more efficient than by glucose. The glycation process induced by fructose leads to rapid oxidation of albumin and, consequently, changes the structure of the protein, affecting its biological functions. The thiol group of Cys residues is particularly susceptible to oxidative stress by free radicals, which damage proteins through disulfide bond formation occurring during protein aggregation, causing loss of enzymatic activity. The direct oxidation of lysine, threonine, and arginine or the secondary reaction of histidine and cysteine residues with reactive carbonyl compounds can lead to the formation of various carbonyl derivatives. The course of the Maillard reaction is monitored by three methods: 1) by detecting the radioactive incorporation of  $^{14}\text{C}/^3\text{H}$  - glucose into the protein, 2) by measuring the reducing power of the Amadori products, and 3) by measuring the fluorescence intensity of the resulting AGEs. In the present study, the latter technique was used. It is useful for finding potential inhibitors of the later phase of the Maillard reaction. Thus, a method in which fluorescence intensity measurements based on AGEs products are performed can serve as a way to find a potential inhibitor of the glycation process at all its stages, i.e., from the binding of reducing sugar to albumin to the formation of AGEs products.

Near-physiological conditions were used in this research: human albumin at a concentration corresponding to that in plasma, incubation period of several weeks. Incubation period is very important because the rate of formation of AGEs is slow under physiological conditions. Inhibitors of the formation of AGEs that are a major cause of diabetic complications should be detected to the greatest extent by screening. Therefore, a suitable screening system was developed, which can be called the identification of inhibitors of glycation. Unfortunately, a downside of this system is a long incubation period and slow response, i.e., long waiting time. Higher temperature can be used for solving this problem. However, another issue emerges when using this method: by using a higher temperature and shorter inhibition period, it is possible to encounter fluorescence interference created by autofluorescent substances and some pigments

found in natural plant extracts. Using high temperature (more than 40°C), Maatsura [208] found significant conformational changes in bovine albumin, namely a partial transformation of the  $\alpha$  helical structure into a  $\beta$  structure. However, it is important to note that the researchers in the study used BSA with a high purity crystalline structure, while the V fraction of BSA was used in this work, which may differ in the behavior of structure stability depending on temperature. Therefore, in this study, a screening system was developed using high temperature and short incubation time. As mentioned earlier, plant extracts contain a large amount of autofluorescent and staining substances that can affect the fluorescence values of AGEs products. The fluorescence intensity of these substances is sometimes so high that in some samples it was more than 10 times higher than in the control. Thus, it is difficult to properly rule out the effect of quenching or color changes or discoloration under the influence of the reactions that occur in the samples under study. Dialysis was used in order to remove these substances. This solution, however, is not entirely ideal and thus it would be useful to conduct additional studies in the future using other methods, such as the use of trichloroacetic acid (TCA) that can successfully remove larger molecules in individual samples, resulting in the precipitation of the AGEs complex – albumin.

The next step of research was to examine selected extracts and fractions in terms of the formation of early and late glycation products, their effect on glycation-induced oxidation of albumin and  $\beta$ -amyloid aggregation. The findings revealed that *R. sachalinensis* best inhibited the formation of early and late glycation products. *R. japonica* exhibited high protection against albumin oxidation and strong inhibitory properties against  $\beta$ -amyloid formation. In contrast, a hybrid *R. x bohemica*, which has the lowest content of polyphenolic compounds compared to other knotweeds, revealed equally strong antiglycation properties. Moreover, there was a strong negative correlation between the thiol groups of protein and  $\beta$ -amyloid, as determined by Congo Red reagent. Assays with the thioflavin T reagent found good correlation with carbonyl groups, fructosamine and AGEs, while AGEs revealed good correlation with fructosamine, carbonyl groups and  $\beta$ -amyloid, as determined by thioflavin T.

The next step was to determine the inhibition curve and perform electrophoresis under denaturing conditions. For IC<sub>50</sub> determination, it was found that some extracts had lower results for IC<sub>50</sub> compared to selected models. In contrast, electrophoresis results proved that there was a marked decrease in the electrophoretic mobility of glycated BSA and HSA compared to samples containing glycated albumins in the presence of extracts. Also, this paper presents the total antiglycation potential of tested extracts, together with a summary in Table "Antiglycation activity at different stages of glycation". In conclusion, this doctoral thesis revealed that tested

extracts and fractions of plants of the genus *Reynoutria* had a significant antiglycation activity. The greatest inhibition of early and late glycation product formation and  $\beta$ -amyloid formation was found among the fractions with the highest content of simple flavan-3-ols, procyanidins with a low degree of polymerisation, and phenylpropanoid disaccharide esters. These compounds are dominant in *R. sachalinensis*. However, the highest protective activity of albumin against glycation was observed for *R. japonica* extract that has the highest content of stilbenes, including resveratrol. Surprising results were found for *R. x bohemica* extract, which contains the highest number of polyphenols, and their protection of carbonyl and thiol groups in albumins via Maillard reaction was lower than in presence of other species. For inhibition of glycation products, however, *R. x bohemica* demonstrated very good activity. Some fractions had similar antiglycation activity to reference values of aminoguanidine compounds and resveratrol compounds. This doctoral thesis revealed that compositional differences in terms of the phytochemical profile of the tested extracts of parental species and hybrid species suggest different mechanisms of antiglycation activity for different classes of metabolites contained therein. Also, a relationship between the mean degree of polymerisation of procyanidins (mDP) and antiglycation activity was found. Although there are many reports on the relationship of mDP procyanidins and antioxidant activity, there are few scientific studies on the relationship of mDP procyanidins and antiglycation properties and on the activity of procyanidins with low degree of polymerization in the glycation process.

In the presented doctoral thesis, the antiglycation potential of extracts isolated from plants of the genus *Reynoutria* was evaluated for the first time. Furthermore, the modifications of glycated BSA and HSA were described, and the glycation screening model for natural raw material was thoroughly designed including all the parameters and conditions of this process. This doctoral thesis revealed important information concerning plants of the genus *Reynoutria* – especially how they inhibit BSA and HSA glycation – and oxidative and amyloidogenic modifications. Hence, the findings may indicate that extracts of different species of the genus *Reynoutria* can be used for inhibiting glycation at its different stages. Antiglycation properties, protection of albumins against oxidation and inhibition of  $\beta$ -amyloid formation may protect cells from the effects caused by long-term glycemic exposure and may potentially reduce the biological sequelae caused by diabetic complications. This fundamental research lays the foundation for the development of new plant preparations that slow down diabetic processes.