



**UNIWERSYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Izabela Nawrot-Hadzik

**”Różnorodność fitochemiczna klączy inwazyjnych roślin leczniczych  
z rodzaju *Reynoutria* oraz ich aktywność przeciwdrobnoustrojowa  
i przeciwutleniająca”**

Rozprawa doktorska

Promotor rozprawy  
*prof. dr hab. Adam Matkowski*  
*Kierownik Katedry i Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej*  
*Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu*  
Promotor pomocniczy  
*Dr Sylwester Ślusarczyk*  
*Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej*  
*Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu*

Wrocław, 2019

## Streszczenie

Kłącze rdestowca ostrokończystego (*Reynoutria japonica* Houtt.) jest znanym w Tradycyjnej Medycynie Chińskiej (TCM-Traditional Chinese Medicine) surowcem leczniczym, stosowanym w leczeniu chorób o podłożu zapalnym, w różnych infekcjach, żółtaczkach, chorobach skóry, oparzeniach czy hiperlipidemii. Od 1977 r. kłącze rdestowca ostrokończystego jest wymieniane w Farmakopei Chińskiej Republiki Ludowej, a od 2017 roku także w Farmakopei Europejskiej wśród leków ziołowych. W XIX wieku ten wschodnioazjatycki gatunek został sprowadzony do Europy wraz z morfologicznie podobnym, ale nie stosowanym w Tradycyjnej Medycynie Chińskiej (TCM) rdestowcem sachalińskim (*R. sachalinensis* [F.Schmidt] Nakai). W Europie po raz pierwszy zaobserwowano występowanie mieszańca wyżej wspomnianych gatunków- *R. x bohemica* Chrtek et Chrtková, który podobnie jak gatunki rodzicielskie charakteryzuje się wysoką inwazyjnością. Podobieństwo morfologiczne opisywanych roślin stwarza możliwość pomylenia gatunku farmakopealnego z pozostałymi, mniej poznanymi rdestowcami występującymi w Europie.

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej miały na celu oznaczenie składu fitochemicznego kłączy inwazyjnych roślin leczniczych rodzaju *Reynoutria*, w tym gatunku farmakopealnego *Reynoutria japonica* oraz morfologicznie podobnych, mniej poznanych *Reynoutria sachalinensis* i mieszańca *Reynoutria x bohemica* oraz opracowanie zwalidowanej metody analitycznej umożliwiającej jednoczesne oznaczenie ilościowe związków istotnych dla różnicowania wymienionych wyżej gatunków rdestowców, w tym również zbadanie równoważności surowca farmakopealnego pochodzącego z Chin i z Polski. Doniesienia naukowe na temat silnej aktywności antyoksydacyjnej *R. japonica* oraz wyniki analiz fitochemicznych przedstawiające także mniej poznane surowce-kłącza *R. sachalinensis* i *R. x bohemica* jako bogate źródło związków fenolowych były powodem postawienia kolejnego celu rozprawy doktorskiej- zbadania aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów z kłączy wyżej wymienionych rdestowców oraz wyjaśnienia wpływu poszczególnych związków chemicznych na całkowity potencjał antyoksydacyjny ekstraktów z wykorzystaniem metod statystycznych (m.in. analizy czynników głównych z ang. PCA-principal component analysis). Zamieszczenie kłącza *R. japonica* w Farmakopei Europejskiej w 2017 roku, stwarza możliwość wykorzystania go w Europie jako tradycyjnego leku roślinnego. Biorąc pod uwagę doniesienia na temat wykorzystania kłączy rdestowca ostrokończystego w koreańskiej medycynie ludowej do utrzymania higieny jamy ustnej kolejnym celem pracy doktorskiej była ocena aktywności przeciwbakteryjnej acetonowych ekstraktów z kłączy *R. japonica*, *R. sachalinensis*, *R. x bohemica* w stosunku do patogenów powodujących próchnicę zębów, w tym dominującego patogenu- *Streptococcus mutans*.

Badania doprowadziły do opracowania zwalidowanej HPLC- DAD- MS metody analitycznej, pozwalającej oznaczyć w badanych surowcach zawartość sześciu związków chemicznych z trzech klas fitochemicznych: piceidu i resweratrolu z klasy stilbenów; emodyny i fiscjonu z klasy antrachinonów; wanikozydu A i wanikozydu B z klasy disacharydowych estrów fenylopropanoidów. Badania wykazały, że farmakopealny surowiec pozyskany z Polski różni się istotnie od pozostałych surowców, a mianowicie kłącze rdestowca sachalińskiego zawierało znacznie mniejszą ilość antrachinonów, brak stilbenów

oraz znacznie większą ilość badanych wanikozydów, co powodowało, że surowiec ten był łatwy w różnicowaniu z surowcem farmakopealnym *R. japonica*. Zawartości badanych związków w kłączu mieszańca zebranego w Polsce wahały się pomiędzy wartościami otrzymanymi dla gatunków rodzicielskich. Zbadano również farmakopealny surowiec *R. japonica* zakupiony w firmie Tong Ren Tang w Chinach i zaobserwowano, że zawierał dwa razy więcej piceidu i resweratrolu niż polski surowiec farmakopealny. Należy jednak nadmienić, że mniejsza ilość resweratrolu i piceidu w polskim surowcu była kompensowana wysoką zawartością innych stilbenów-resweratrolozydu i glukozydu piceatannolu, nieobecnych w surowcu chińskim. Badania dowiodły, że żaden z pozostałych badanych surowców nie powinien być stosowany jako substytut surowca farmakopealnego *R. japonica*. Wnikliwa analiza fitochemiczna doprowadziła do identyfikacji wielu nieobserwowanych dotychczas w surowcu związków z grupy glikozydów diantronowych, oligomerów ligniny, disacharydowych estrów fenylopropanoidów, pochodnych kwasu hydroksycynamonowego. Inne związki zaobserwowane po raz pierwszy to: *N-trans*-feruloilotyramina, *N*-feruloilometoksytyramina, diglukozyd witeksyny lub izowiteksyny. Po raz pierwszy zaobserwowano również wiele z procyanidyn o wysokim stopniu polimeryzacji w kłączach *R. sachalinensis* i *R. x bohemica* oraz potwierdzono ich obecność w kłączach *R. japonica*. Digalusan trimeru procyanidyny został zaobserwowany po raz pierwszy we wszystkich badanych gatunkach. Co więcej, badania izolacyjne, prowadzone w ramach opracowywania ilościowej metody analitycznej ekstraktów badanych gatunków kłączy, doprowadziły do wyodrębnienia i identyfikacji metodami spektroskopowymi (HPLC-DAD-HR-MS, NMR) nowego związku, dotąd nieopisanego w literaturze naukowej: (3,6-O- di-p-kumaroilo)- $\beta$ -fruktofuranozylo-(2 $\rightarrow$ 1)-(2'-O-acetyl-6'-O-feruloilo)- $\beta$ -glukopyranozyd). Oznaczona zawartość tanin i fenoli zmodyfikowaną metodą Folin-Ciocalteu, a także zawartość proantocyjanidyn testem z DMACA-HCl i testem z kwaśnym butanolem (metoda Bate-Smitha) była bardzo wysoka we frakcjach o wysokim potencjale antyoksydacyjnym, która to zależność została potwierdzona wysokim współczynnikiem korelacji rang Spearmana. Analiza czynników głównych (ang. PCA- principal component analysis), przeprowadzona z wykorzystaniem danych LC-MS (pole powierzchni piku, czas retencji) oraz z wykorzystaniem wyników przeprowadzonych testów antyoksydacyjnych i testów na zawartość grup związków pozwoliła zaobserwować wpływ poszczególnych związków na potencjał antyoksydacyjnych ekstraktów i frakcji. Badania wykazały, że kłącza rdestowców są bogatym źródłem proantocyjanidyn, które istotnie przyczyniają się do ich wysokiej aktywności antyoksydacyjnej, dotychczas wiązanej przede wszystkim z obecnością stilbenów.

Badania prowadzone na acetonowych ekstraktach z kłączy wykazały, że ekstrakt z *R. japonica* posiada najwyższą aktywność bakteriostatyczną i bakteriobójczą przeciwko dominującemu patogenowi powodującemu próchnicę- *S. mutans* (MIC=1000  $\mu$ g/mL i MBC=2000  $\mu$ g/mL), co może wiązać się z zaobserwowaną najwyższą zawartością aglikonów stilbenów i aglikonów antrazwiązków spośród badanych ekstraktów. Biorąc pod uwagę, że ekstrakt *R. japonica* wykazał również najslabszy efekt cytotoksyczny w stosunku do ludzkich fibroblastów jamy ustnej, ujawniający się dopiero przy stężeniu powodującym śmierć wszystkich *S. mutans*, należy go rozważyć, jako potencjalny antybakteryjny środek, pomocny w prewencji i leczeniu próchnicy.

## Życiorys

### Izabela Nawrot-Hadzik

Magister farmacji.

Asystent w Katedrze Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

### Wykształcenie:

2012-2016 Studia doktoranckie w Katedrze Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

2011-2015 Studia podyplomowe na Wydziale Farmaceutycznym UMW, z zakresu farmacji aptecznej. Uzyskanie tytułu specjalisty Farmacji aptecznej

2004-2009 Studia farmaceutyczne na Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, wydział Farmaceutyczny.

### Granty:

2013-2016 Kierownik Projektu NCN, grant PRELUDIUM no. 2012/07/N/NZ7/02420. „Rola związków polifenolowych w aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalne *in vitro* garbnikowych surowców leczniczych pochodzenia chińskiego”.

2012-2016 Wykonawa projektu NCN, grant OPUS, no. 2011/03/B/NZ9/04763 „Ograniczanie występowania roślin inwazyjnych z rodzaju *Solidago* i *Reynoutria* z wykorzystaniem biomasy do pozyskiwania biologicznie czynnych metabolitów”.

### Dorobek naukowy:

- 14 opublikowanych prac,
- 30 doniesień zjazdowych

**Liczba punktów MNiSW/KBN:** 247,00

**Impact factor :** 18,321 (9 pełnych prac)

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowi zbiór 3 artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych o łącznym IF = 7,486.

1. Nawrot-Hadzik I., et al. Isolation and Determination of Phenolic Glycosides and Anthraquinones from Rhizomes of Various Reynoutria Species. *Planta Med.* 2018, 84, 1118-1126.
2. Nawrot-Hadzik I., et al. Phytochemical Diversity in Rhizomes of Three Reynoutria Species and their Antioxidant Activity Correlations Elucidated by LC-ESI-MS/MS Analysis. *Molecules.* 2019 Mar 21;24(6).
3. Nawrot-Hadzik I., et. al. Chemical Composition of East Asian Invasive Knotweeds, their Cytotoxicity and Antimicrobial Efficacy Against Cariogenic Pathogens: An In-Vitro Study. *Med Sci Monit.* 2019, 25, DOI: 10.12659/MSM.913855