

mgr inż. Rafał Ziewiecki
Politechnika Wrocławska
Wydział Chemiczny
Zakład Technologii Organicznej i Farmaceutycznej

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

*Sposób otrzymywania roślinnych koniugatów
polifenolowo-polisacharydowych, a ich struktura i właściwości antykoagulacyjne.*

Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest próba modyfikacji procesu otrzymywania polifenolowo-polisacharydowych koniugatów o właściwościach antykoagulacyjnych, które uzyskiwane są z wybranych, popularnych w Polsce roślin leczniczych. Rozprawa skupia się na określeniu charakteru chemicznego otrzymanych makromolekuł i odnalezieniu korelacji pomiędzy ich strukturą a mechanizmem aktywności biologicznej.

Pierwsza część rozprawy składa się z przeglądu literaturowego, przedstawiającego obecny stan wiedzy w dziedzinach związanych z tematyką pracy doktorskiej. Omówiony został podział koniugatów polisacharydowych opisany ze względu na ich strukturę, z uwzględnieniem ich występowania i właściwości biologicznych. Opisanie zostały również substancje polisacharydowe, wykazujące działanie antykoagulacyjne wobec osocza krwi – zarówno związki, które są obecnie stosowane w leczeniu i prewencji chorób sercowo-naczyniowych, jak i substancje pochodzenia naturalnego, będące dopiero obiektem badań naukowców. W części teoretycznej rozprawy przybliżone także zostały tradycyjne i nowoczesne metody izolowania polisacharydów i ich koniugatów z surowców naturalnych, a także techniki badawcze służące do określania charakteru chemicznego glikokoniugatów, z uwzględnieniem zalet i wad tych metod.

Druga część rozprawy zawiera opis badań własnych, jakie wykonał doktorant w ramach pracy doktorskiej, oraz ich rezultatów wraz z omówieniem. Rozdział pierwszy opisuje badania nad izolowaniem glikokoniugatów z kwiatostanów rumianku pospolitego (*Matricaria chamomilla* L.). Izolat został otrzymany na drodze wieloetapowego procesu polegającego głównie na przeprowadzeniu szeregu procesów ekstrakcji w rozpuszczalnikach organicznych. Następnie został on poddany analizie mającej na celu określenie *in vitro* jego właściwości antykoagulacyjnych jak też mechanizmów tejże aktywności. Ponadto opisane zostały badania *in vivo* oraz *ex vivo*, przeprowadzone odpowiednio na szczurach rasy Wistar oraz na osoczu krwi szczurzej pobranej tuż po podaniu zwierzęciu odpowiedniej dawki preparatu roślinnego. Przeprowadzono także wstępną charakterystykę chemiczną badanego środka roślinnego. Rozdział drugi badań własnych skupia się na pracach mających na celu poszerzenie puli badanego materiału roślinnego o następujące surowce: ziele poziomki pospolitej (*Fragaria vesca* L.), kwiatostany głogu jednoszyjkowego (*Crataegus monogyna* Jacq.) oraz ziele jeżyny fałdowanej (*Rubus plicatus* W. et N.). Z wymienionych roślin wyizolowano glikokoniugaty, które podobnie jak preparat z rumianku pospolitego, zostały zbadane *in vitro* pod względem właściwości antykoagulacyjnych, z uwzględnieniem mechanizmów działania oraz przeprowadzono wstępne badania dotyczące ich charakteru

chemicznego. Rozdział trzeci opisuje próby modyfikacji procesu izolowania glikokoniugatów ze wszystkich 4 wymienionych surowców roślinnych, mające na celu skrócenie, uproszczenie i/lub uczynienie procedury bardziej przyjazną dla środowiska, przy jednoczesnym uzyskaniu glikokonjugatu roślinnego o aktywności nie gorszej niż ta wykazana przez produkty otrzymane metodą pierwotną. Oceniono *in vitro* aktywność antykoagulacyjną otrzymanych preparatów roślinnych oraz określono mechanizmy ich aktywności. Dodatkowo preparat z rumianku pospolitego, który wykazał najbardziej obiecujące wyniki w testach koagulologicznych został poddany w końcowym etapie procesu filtracji membranowej, co pozwoliło zastąpić żmudny proces dializy, w celu otrzymania wielkocząsteczkowego produktu końcowego. Preparat ten zbadano pod kątem jego właściwości antykoagulacyjnych oraz przeprowadzono jego szczegółową analizę chemiczną technikami GLC-MS, HPLC, FT-IR oraz ^1H NMR i ^1H - ^{13}C HSQC. Ostatni rozdział części opisującej badania własne przedstawia prace nad rozdzieleniem frakcji produktu z rumianku pospolitego na homogenne frakcje. Otrzymane składniki, podobnie jak preparat natywny zostały scharakteryzowane pod kątem ich struktury chemicznej oraz właściwości antykoagulacyjnych, z uwzględnieniem mechanizmów ich działania.

Wyniki uzyskane w toku opisanych w rozprawie doktorskiej badań zostały podsumowane, uwypuklając zachodzenie zależności między sposobem otrzymywania glikokoniugatów roślinnych a ich charakterem chemicznym jak też właściwościami biologicznymi.

The subject of the dissertation is an attempt to modify the process for obtaining polyphenolic-polysaccharide conjugates, which are received from selected, popular in Poland medicinal plants. The dissertation is focused on identifying the chemical character of obtained macromolecules and finding the correlation between their structure and mechanism of the biological activity.

The first part of the thesis consists of a literature review, presenting the current state of knowledge in the fields related to the subject of the dissertation. The division of polysaccharide conjugates in terms of their structure, taking into consideration their distribution and biological properties, was described. They have also been described polysaccharide substances exhibiting anticoagulant activity against blood plasma - either compounds which are currently used in the treatment and prevention of cardiovascular diseases, as well as natural substances, which are only studied by scientists. In theoretical part of dissertation, also the traditional and modern methods for purification of polysaccharides and their conjugates for natural materials, and analyzing techniques for determining the chemical nature of the glycoconjugates, taking into account the advantages and disadvantages of these methods, were described.

The second part of the thesis contains a description of own research, which was done by a PhD student within the doctoral thesis, and their results together with a discussion. The first chapter describes the research on the isolation of glycoconjugates of inflorescences of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). the isolate was obtained by the multistage process consisting mainly of carrying out a series of extraction processes in organic solvents. Next, plant preparation was analyzed in order to determine the *in vitro* anticoagulant properties as well as the mechanisms of that activity. Furthermore, the *in vivo* and *ex vivo* tests carried out respectively in Wistar rats and in plasma of the rat taken shortly after administration to the animal a suitable dose of the plant preparation, were described. A preliminary characterization of the chemical plant of the analyzed plant extraction were also carried out. The second chapter focuses on work to expand the pool of the tested plant material for the following materials: herb of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.), inflorescences of common hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) and herb of blackberry (*Rubus plicatus* W. et N.). From these plants glycoconjugates were isolated, which, like in case of preparation from chamomile, were tested for *in vitro* anticoagulant properties, including mechanisms of their activity and for their chemical character. The third chapter describes the attempts of modifying the process of glycoconjugates isolation of all of 4 mentioned plant materials, that was aimed at shortening, simplifying and/or making the procedure more environmental friendly, while obtaining glycoconjugate with activity not worse than that shown by the products obtained by the primary procedure. Anticoagulant activity and of received plant preparation was evaluated *in vitro* and mechanisms of mentioned activity was analyzed. Additionally, the preparation isolated from chamomile, which has shown the most promising results in the coagulation tests, has been subjected to the membrane filtration, which allowed to replace the arduous process of dialysis, to obtain a macromolecular final product. This preparation was tested for its anticoagulant properties and its chemical structure was analyzed with techniques: GLC-MS, HPLC, FT-IR and ¹H NMR and ¹H-¹³C HSQC. The last chapter describes work on the separation of the fraction of chamomile preparation to the form of homogenous fractions.

Obtained components have been characterized in terms of chemical structure, anticoagulant properties and mechanisms of their action.

The results obtained during the studies performed within the dissertation were summarized, highlighting occurring relationship between the plant glycoconjugate obtaining method and their chemical structure as well as biological properties.