

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

„Wpływ mikrootoczenia na mechanizm antyoksydacyjnego działania izotiocyanianów”

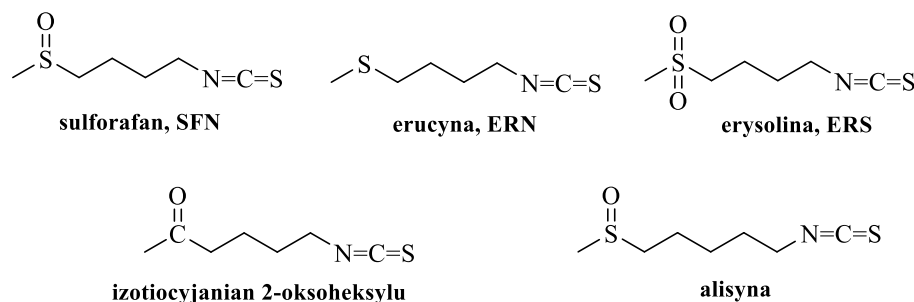
Promotor: prof. dr hab. Grzegorz Litwinienko

Celem przeprowadzonych badań w ramach realizowanej pracy doktorskiej było poszerzenie wiedzy na temat wybranej grupy izotiocyanianów (ITC), złożonej z sulforafanu (SFN) i jego naturalnych analogów, poprzez określenie ich przeciwrodnikowych oraz antyoksydacyjnych właściwości w ujęciu jakościowym i ilościowym.

Naturalne ITC, w tym SFN i jego analogi, które dostarczane są do organizmu w wyniku spożywania typowych warzyw z rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*), wykazują właściwości chemioprewencyjne, przeciwnowotworowe oraz przeciwzapalne. Ich prozdrowotne właściwości kojarzone są najczęściej ze zdolnością do aktywacji enzymów produkujących endogenne antyoksydanty, dzięki czemu związki te postrzegane są jako substancje wspomagające (czyli za antyoksydanty „niebezpośrednie”, ang. *indirect antioxidants*). Z drugiej strony, jak wskazują nieliczne doniesienia literaturowe, SFN i jego analogi reagują z rodnikami np. stabilnym rodnikiem 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowym (dpph•) oraz anionorodnikiem nadadtlenkowym czy rodnikiem alkilnadadtlenkowym. Sugeruje to, że ITC, które nie zawierają typowych dla antyoksydantów grup funkcyjnych (fenolowej, aminowej czy sprzężonego układu wiązań podwójnych), potencjalnie mogą wykazywać bezpośrednie właściwości przeciwutleniające, redukując reaktywne formy tlenu i azotu. Mechanizm tych reakcji oraz związek struktury ITC z ich reaktywnością nie został jak dotąd rozpoznany, a zdecydowana większość dostępnych w literaturze parametrów określających ich aktywność jest silnie skorelowana z warunkami prowadzenia eksperymentu (stężenia reagentów, czasu prowadzenia reakcji).

Przypuszczalnie, mechanizm antyoksydacyjnego działania ITC jest zależny od szeregu czynników, np. polarności rozpuszczalnika, obecności kwasów, zasad i kationów/anionów, rodzaju układu (homogeniczny/heterogeniczny) czy temperatury, dlatego w pracy doktorskiej postawiona została hipoteza, że czynniki te mogą wpływać na mechanizm reakcji ITC z rodnikami ujawniając lub wyciszając ich antyrodnikowe właściwości. W celu weryfikacji tej hipotezy, zaplanowane zostały badania eksperymentalne. Obejmowały one syntezę wybranych ITC (SFN i jego dwóch naturalnych analogów, erucyny (ERN) i erysoliny (ERS)), oraz kompleksowe badania aktywności przeciwrodnikowej i przeciwutleniającej wybranej

grupy ITC (SFN, ERN, ERS, izotiocyjanianu 2-oksoheksylu oraz homologu SFN, alisyny, Rys. 1) w modelowych układach chemicznych. Badania te zostały podzielone na trzy etapy.



Rysunek 1. Wzory strukturalne SFN, ERN, ERS, izotiocyjanianu 2- oksoheksylu i alisyny.

W pierwszym etapie badano kinetykę reakcji z rodnikiem $\text{dpph}^\bullet$ (technika *Stopped flow*) w rozpuszczalnikach o różnej polarności. Badane ITC były zdolne do redukcji rodnika $\text{dpph}^\bullet$, jednak reakcje te przebiegają wolniej niż dla modelowych antyoksydantów fenolowych, 2,2,5,7,8-pentametylo-6-chromanolu (PMHC) i 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu (BHT). Wyznaczone wartości absolutnych stałych szybkości reakcji (k^s) badanych ITC dla reakcji z $\text{dpph}^\bullet$ pozwoliły na powiązanie ich struktury z reaktywnością (*Structure-Activity-Relationship*):

a) obecność obydwu grup funkcyjnych ($\text{S=O} / \text{O=S=O}$ i N=C=S) w SFN i ERS odpowiada za zwiększoną szybkość reakcji tych związków z $\text{dpph}^\bullet$,

b) pośród badanych ITC, zwiększenie liczby grup metylenowych z 4 do 5 w łańcuchu węglowym oraz zamiana grupy sulfinyłowej (S=O) na grupę karbonyłową (C=O) zmniejszają ich aktywność przeciwrodnikową.

Stwierdzono, że aktywność antyrodnikowa SFN (oraz innych badanych ITC) zależy w dużej mierze od polarności rozpuszczalnika, co świadczy o możliwej zmianie mechanizmu reakcji. Podjęto próbę wyjaśnienia tego efektu badając czy dodatek kwasu Lewisa do mikrośrodowiska reakcji wpłynie na potencjał antyrodnikowy ITC. Na podstawie obserwacji, że w obecności kationów Mg^{2+} szybkość reakcji dla SFN wzrasta i po przeprowadzeniu serii obliczeń teoretycznych metodami DFT i CBS zaproponowano, że SFN reaguje z rodnikiem $\text{dpph}^\bullet$ według mechanizmu PCET (*Proton Coupled Electron Transfer*). Mechanizm ten polega na jednoczesnym transferze elektronu z atomu azotu grupy izotiocyjanianowej SFN oraz przeniesieniu protonu z ugrupowania metylenowego znajdującego się w pozycji α do grupy $-\text{NCS}$.

Drugi etap badań obejmował pomiary szybkości inicjowanej autooksydacji kumenu w układzie homogenicznym (chlorobenzen) w temperaturze 30 °C w obecności ITC. Na podstawie uzyskiwanych krzywych pochłaniania tlenu oraz analizy numerycznej wyznaczano parametry kinetyczne procesu: szybkość reakcji autooksydacji nieinhibowanej (R_{ox}), inhibowanej (R_{inh}), długość łańcucha kinetycznego (ν) oraz stałą szybkości reakcji inhibicji (k_{inh}). Pomiary te wskazały, że wartość stałej szybkości reakcji ITC z rodnikami alkilnadrtlenkowymi ($\text{ROO}^\bullet$), $k_{\text{inh}} < 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, jest zbyt niska by związki te mogły być postrzegane jako antyoksydanty interwentywne (przerywające łańcuch kinetyczny autooksydacji).

W ostatnim etapie badano wpływ SFN i ERN na stabilność oksydacyjną analogów lipidowych, różniących się podatnością na utlenianie oraz termostabilnością oksydacyjną: kwasu linolenowego (LNA), oleju słonecznikowego (SUN) oraz lecytyny sojowej (LEC). Pomiarów wykonano przy użyciu skaningowej kalorymetrii różnicowej (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC). Na podstawie krzywych DSC wyznaczano temperatury początku utleniania (T_e) i następnie, za pomocą metody Ozawy-Flynn-Walla, obliczano parametry kinetyczne z równania Arrheniusa dla oksydacji czystych i domieszkowanych SFN i ERN matryc lipidowych – energię aktywacji (E_a), czynnik przedwykładniczy (Z) oraz globalne stałe szybkości reakcji k w danej temperaturze. Rezultaty pokazały, że ERN i SFN działają jak inhibitory utleniania SUN i LEC w zakresie temperatur 100 – 150 °C (w podanych warunkach ERN była efektywniejszym inhibitorem), natomiast nie wykazywały właściwości antyoksydacyjnych podczas termoutleniania LNA (w temperaturze poniżej 100°C). Uzyskane wyniki uzupełnione zostały o rezultaty badań produktów termicznego rozkładu SFN i ERN, które wykonano przy użyciu techniki chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Pozwoliło to na zaproponowanie mechanizmu antyoksydacyjnego działania SFN i ERN podczas utleniania SUN i LEC. W podwyższonej temperaturze następuje rozkład termiczny tych dwóch ITC do kwasu metanosulfenowego oraz rodników metylosulfinylowych. Obydwa te indywidua szybko reagują z rodnikami $LOO^\bullet$, przerywając łańcuch kinetyczny autooksydacji.

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej potwierdziły, że aktywność ITC jest silnie zależna od środowiska reakcji (polarność rozpuszczalnika, obecność jonów, rodzaj układu, temperatura). Ustalono również związek struktury z reaktywnością oraz zaproponowano mechanizmy przeciworodnikowego oraz antyoksydacyjnego działania w badanych układach modelowych. Takie podejście nie zostało jak do tej pory zaprezentowane w literaturze, a uzyskane wyniki znacząco poszerzają wiedzę na temat właściwości naturalnych ITC w kontekście zarówno chemii wolnych rodników i antyoksydantów niefenolowych, jak również chemii żywności.

Spis publikacji naukowych w których uwzględniono wyniki badań uzyskanych w ramach realizowanej pracy doktorskiej:

- 1) J. Cedrowski, K. Dąbrowa, A. Krogul-Sobczak, G. Litwinienko, A Lesson Learnt from Food Chemistry—Elevated Temperature Triggers the Antioxidant Action of Two Edible Isothiocyanates: Erucin and Sulforaphane, *Antioxidants*, **2020**, 9, 1090.
- 2) J. Cedrowski, K. Dąbrowa, P. Przybylski, A. Krogul-Sobczak, G. Litwinienko, Antioxidant activity of two edible isothiocyanates: Sulforaphane and erucin is due to their thermal decomposition to sulfenic acids and methylsulfinyl radicals, *Food Chemistry*, **2021**, 353, 129213.
- 3) J. Cedrowski, J. Grębowski, G. Litwinienko, Antioxidant Activity of Edible Isothiocyanates, Rozdział 13 w książce *Lipid Oxidation in Food and Biological Systems*, **2022**, 277-303, ISBN: 9783030872212, Springer.