

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**Study of antioxidant and synergistic action of selected phenols
and polyphenols in model lipid-water systems**

Tytuł w języku polskim:

**Badanie antyoksydacyjnego i synergistycznego działania wybranych
fenoli i polifenoli w modelowych układach wodno-lipidowych**

Promotor: prof. dr hab. Grzegorz Litwinienko

Autooksydacja lipidów jest łańcuchowym procesem wolnorodnikowym, który prowadzi do wielu patologicznych zjawisk w organizmach żywych, a także do psucia się żywności, kosmetyków i farmaceutyków. Antyoksydanty fenolowe (ArOH) są znanymi inhibitorami autooksydacji, szeroko stosowanymi w różnych gałęziach przemysłu i medycyny. Działają głównie jako antyoksydanty interwencyjne, tj. redukują rodnik nadtlenkowy lipidu ($\text{LOO}^\bullet$), tworząc wodoronadtlenek (LOOH) i stosunkowo stabilny rodnik fenoksyłowy ($\text{ArO}^\bullet$). Ostatnie dwadzieścia lat przyniosło nowe spojrzenie na rolę mikrośrodowiska w mechanizmie działania antyoksydantów fenolowych. W literaturze zaproponowano kilka mechanizmów tego procesu, w tym przeniesienie elektronu sprzężone z przeniesieniem protonu (PCET), przeniesienie elektronu poprzedzone deprotonacją grupy OH (SPLET) oraz przeniesienie protonu poprzedzone przeniesieniem elektronu (ET-PT). Mimo to, nadal istnieje wiele podstawowych, ale jeszcze słabo scharakteryzowanych czynników wpływających na ogólną podatność układu na peroksydację, czynnikami takimi są pH, temperatura, charakter powierzchni międzyfazowej lipid/woda (kropelki lub liposomy) oraz obecność ko-antyoksydantów.

Celem pracy było określenie wpływu jonizacji i podziału międzyfazowego wybranych związków fenolowych na mechanizm ich antyoksydacyjnego działania oraz synergistyczne interakcje z analogami α -tokoferolu w modelowych układach wodno-lipidowych. Do badań wybrano dwa analogi α -tokoferolu, rozpuszczalny w wodzie Trolox i rozpuszczalny w lipidach 2,2,5,7,8-pentametyl-6-chromanol (PMHC), oraz szereg związków fenolowych o różnym schemacie hydroksylacji: 3-hydroksyflawon, 7-hydroksyflawon, 7,8-dihydroksyflawon, 3,5,7-trihydroksyflawon (galangina), 3',4',5,7-tetrahydroksyflawon (luteolina), 3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon (kwercetyna), silybina, 2,3-dehydrosilybina, 1,2-dihydroksybenzen (katechol) i 3,4-kwas dihydroksycynamonowy (kwas kawowy).

Pierwsza część pracy obejmowała badanie kinetyki działania antyoksydacyjnego wybranych polifenoli w układach homogenicznych. Eksperymenty prowadzono w rozpuszczalnikach organicznych o różnej polarności i zdolności do jonizacji fenoli, uzyskując w

ten sposób wstępną ocenę aktywności antyoksydacyjnej na podstawie danych kinetycznych niezakłóconych przez podział między fazy. Istotnym etapem było wyznaczenie stałych kwasowości fenoli (pK_a) wraz z ich przypisaniem do poszczególnych grup hydroksylowych. Wykazano, że mechanizm reakcji silybiny, 2,3-dehydrosilybiny i luteoliny z modelowym rodnikiem 2,2-difenylo-1-pikrylhydrazylowym (dpph^{*}) w układach homogenicznych zależy od polarności rozpuszczalnika. W niepolarnym dioksanie reakcja przebiega wyłącznie według mechanizmu HAT, natomiast w rozpuszczalnikach polarnych według mieszanego mechanizmu HAT/SPLET. Udział SPLET wzrasta ze wzrostem polarności rozpuszczalnika w różnym stopniu dla poszczególnych grup fenolowych/enolowych ze względu na ich różną kwasowość. Za zwiększoną reaktywność wybranych związków w rozpuszczalnikach polarnych odpowiada głównie grupa enolowa (w pozycji 3) w 2,3-dehydrosilybinie i grupa hydroksylowa katecholu (pozycja 4') w luteolinie. Ta część projektu została również uzupełniona o badania elektrochemiczne właściwości redoks silybiny i 2,3-dehydrosilybiny, które wykazały ich silną zależność od pH. Utlenianie 2,3-dehydrosilybiny przy niższych potencjałach niż silybiny było zgodne z jej lepszymi właściwościami przeciwrodnikowymi, obserwowanymi podczas pomiarów kinetycznych (reakcja z dpph^{*}).

Następnie badano kinetykę reakcji (poli)fenoli z lipidowymi rodnikami nadtlenkowymi w układach micelarnych w szerokim zakresie pH. Stwierdzono znaczny wpływ deprotonacji określonych grup hydroksylowych na mechanizm działania związków fenolowych. Wykazano, że kluczową rolę odgrywa deprotonacja grupy enolowej 3-OH w strukturze flawonoidu i pierwszej grupy OH w ugrupowaniu katecholowym. Wniosek ten potwierdzają następujące wyniki:

- a) związki bez grupy 3-OH i grupy katecholowej (7-hydroksyflawon i silybina) wykazywały jedynie działanie retardacyjne, minimalnie zależne od pH,
- b) obecność enolowej grupy 3-OH (w 3-hydroksyflawonie, galanginie i 2,3-dehydrosilybinie) prowadziła do wzmocnienia aktywności antyoksydacyjnej w warunkach sprzyjających jonizacji tej grupy ($pH \geq 7,0$), a więc umożliwiających szybki mechanizm SPLET,
- c) reaktywność związków katecholowych jest kontrolowana termodynamicznie w kwaśnym pH: związki o wystarczająco niskiej entalpii dysocjacji wiązań O-H (kwas kawowy, 7,8-dihydroksyflawon i kwercetyna) działały jako antyoksydanty interwentywne według mechanizmu HAT, a pozostałe (luteolina i katechol) były jedynie retardantami. Przy wyższym pH dominuje kontrola kinetyczna: deprotonacja grupy hydroksylowej w ugrupowaniu katecholowym umożliwia szybkie przeniesienie elektronu z anionu fenolanowego do rodnika nadtlenkowego (mechanizm SPLET), powodując znacznie zwiększoną aktywność badanych związków. Z kolei spadek reaktywności przy $pH \geq 9,0$ przypisano reakcji anionów katecholanowych z tlenem cząsteczkowym, prowadzącym do zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu.

Ostatnia część pracy dotyczyła synergistycznych oddziaływań między związkami fenolowymi i obejmowała badania dwuskładnikowych mieszanin (poli)fenoli z analogami α -tokoferolu w układach dwufazowych w szerokim zakresie pH. Rodzaj i wielkość oddziaływań zanalizowano w oparciu o mechanizmy indywidualnego działania i właściwości pary fenoli oraz pH układu. Zaproponowano następujące mechanizmy synergizmu pomiędzy dwoma antyoksydantami fenolowymi:

- a) związki nieposiadające ugrupowania katecholowego, które indywidualnie są retardantami, działając prewentywnie prowadzą do oszczędzania analogu α -tokoferolu,
- b) związki posiadające ugrupowanie katecholowe mogą regenerować analog α -tokoferolu; wielkość efektu synergistycznego wzrasta wraz z postępującą deprotonacją pierwszej grupy hydroksylowej w ugrupowaniu katecholowym (udział mechanizmu SPLET), natomiast przy $\text{pH} \geq 9,0$ maleje w skutek reakcji ubocznych ko-antyoksydanta.

Zidentyfikowano również dwa pozostałe rodzaje oddziaływań:

- a) efekt addytywny, polegający na indywidualnym działaniu antyoksydanta i ko-antyoksydanta konkurujących o rodniki nadtlenkowe,
- b) antagonizm, który może być spowodowany regeneracją ko-antyoksydanta przez anion analogu α -tokoferolu (możliwą tylko w przypadku, gdy ten pierwszy ma słabsze właściwości redukujące).

Opracowano również nową metodę ilościowego opisu zjawiska synergizmu, uwzględniającą zarówno czas efektywnego działania antyoksydanta w układzie (okres indukcji, czas inhibicji) jak i jego skuteczność (szybkość procesu autooksydacji w trakcie inhibicji). Dodatkowo, zaproponowano nowy, graficzny sposób prezentacji wyników synergizmu antyoksydacyjnego w formie mapy, który umożliwia szybką ocenę optymalnego składu mieszaniny i środowiska działania.

Pomiary współczynników dystrybucji ($\log D$) dla wszystkich badanych związków pozwoliły również na dyskusję wpływu podziału pomiędzy fazę lipidową i wodną na aktywność antyoksydacyjną. Niestety, w przypadku indywidualnych związków fenolowych efekt kinetyczny wynikający z jonizacji okazał się dominujący, maskując możliwe efekty związane z dystrybucją. Wyniki uzyskane dla mieszanin dwóch (poli)fenoli sugerują istotną rolę lokalizacji głównego antyoksydanta (bardziej skutecznego związku) w układzie dwufazowym dla oddziaływań synergistycznych z ko-antyoksydantem: główny antyoksydant powinien być silnie hydrofobowy, aby osiągnąć większy synergizm.

Część wyników prezentowanych w pracy doktorskiej została zamieszczona w publikacjach:

- 1) E. van Wenum, R. Jurczakowski, G. Litwinienko, Media effects on the mechanism of antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin: Role of the enol group, *The Journal of Organic Chemistry*, **2013**, 78, 9102-9112.
- 2) E. Kowalewska, G. Litwinienko, Fenolowe antyoksydanty interwentywne – aktywność i mechanizmy działania, *Postępy Biochemii*, **2010**, 56, 274-283.
- 3) K. Jodko, E. Kowalewska, B. Sikora, G. Litwinienko Studies on the synergistic effects of PMHC (an analogue of vitamin E) and selected catecholamines in the context of neurodegenerative diseases. *Free Radical Research*, **2009**, 43, 58.
- 4) E. Kowalewska, K. Jodko, I. Stańczak, G. Litwinienko, Antioxidant synergy between silybin, dehydrosilybin and analogue of vitamin E. *Free Radical Research*, **2009**, 43, 58.