



Dr hab. Piotr Wałęjko
Wydział Chemii
Uniwersytet w Białymstoku
ul. K. Ciołkowskiego 1K
15-245 Białystok

Białystok, 22.09.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Eweliny van Wenum

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

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

Przedłożona do recenzji praca doktorska mgr Eweliny van Venum została wykonana w Laboratorium Technologii Organicznych Materiałów Funkcjonalnych, Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorz Litwinienko, w bardzo dobrym laboratorium, przygotowanym do prowadzenia zaawansowanych badań w zakresie peroksydacji lipidów oraz aktywności antyoksydacyjnej polifenoli w układach homo- i heterogenicznych.

Co do znaczenia utleniania wolnorodnikowego to należy zaznaczyć, że proces ten związany jest z wieloma niekorzystnymi zmianami zachodzącymi w obrębie żywych komórek, żywności, kosmetykach, lekach i różnorodnych surowcach przemysłowych. Wielu autorów uważa, że przeciwdziałanie, jak też niwelowanie jego skutków, jest jednym z największych wyzwań naszych czasów.

Antyoksydanty to substancje zdolne do hamowania wolnorodnikowej peroksydacji lipidów, szeroko stosowane w przemyśle i medycynie. Natomiast niniejsza praca poświęcona jest badaniu wpływu antyoksydantów fenolowych, tzw. interwentywnych (*ang. chain breaking antyoksydant*), na proces autooksydacji lipidów. Należy zaznaczyć, że pomimo intensywnych badań, pełny mechanizm ich działania oraz wpływ czynników na udział odpowiedniego mechanizmu w danym procesie nie jest jeszcze w pełni poznany. Jak zaznacza Autorka badania nad mechanizmem autooksydacji lipidów prowadzono zazwyczaj przy pH=7,4 podczas gdy w produktach żywnościowych wynosi ono od czterech do sześciu. Ponadto są to złożone procesy odbywające się w układach dwufazowych, gdzie podział międzyfazowy może znacząco wpływać na mechanizm działania antyoksydantów,

a zagadnienie to nie zostało jeszcze dobrze rozpoznane w literaturze przedmiotu. Z uwagi na powyższe uważam, że zaproponowany przez Autorkę cel główny dysertacji, którym było: określenie wpływu pH na hamowanie autooksydacji lipidów przez związki fenolowe w układach dwufazowych posiada istotny element nowości, a wybór tematu badań uważam za trafny i właściwy. Praca ma również istotny aspekt użytkowy. Uzyskane wyniki mogą pomóc w opracowaniu procesów technologicznych, zapewniających optymalne warunki zachowania pożądanych właściwości substancji aktywnych w lekach, suplementach diety, kosmetykach i żywności, ulegających autooksydacyjnej degradacji.

Praca została przygotowana w tradycyjnej formie w języku angielskim. Liczy 135 stron maszynopisu i składa się z czterech głównych części: trzydziestu stron wstępu, piętnastu przedstawiających stosowane materiały i metody badawcze oraz części zawierającej uzyskane wyniki (30 str. opatrzonej 20 rysunkami) i dyskusję nad nimi (44 str. opatrzonej 27 rysunkami). Wstęp poprzedza krótkie streszczenie w języku polskim i angielskim, spis najczęściej stosowanych symboli i skrótów oraz krótkie wprowadzenie nakreślające cele pracy oraz ich uzasadnienie. W końcowej części pracy Autorka umieściła obszernie podsumowanie uzyskanych wyników oraz spis literatury związanej z omawianym zagadnieniem liczący 290 pozycji. W tym fundamentalne dla tematu badań prace prof. G.W. Burtona oraz prof. K.U. Ingolda oraz szereg prac oryginalnych opublikowanych w XXI wieku, które potwierdzają aktualność opisanych w dysertacji badań.

Przegląd literaturowy Autorka rozpoczęła od krótkiego rysu historycznego przedstawiając ewolucję poglądów na temat znaczenia wolnych rodników w biologii i chemii. Następnie przybliżyła definicję Reaktywnych Form Tlenu (RFT) ze szczególnym uwzględnieniem anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) oraz rodnika wodorotlenowego ($\cdot OH$), powstających w wyniku kilkustopniowej redukcji tlenu cząsteczkowego (O_2) oraz tzw. reakcji Fentona. Po zapoznaniu czytelnika z właściwościami RFT Autorka przedstawiła bieżący stan wiedzy na temat skutków ich działania na biomolekuły, takie jak białka i DNA skupiając się na procesie autooksydacji lipidów, metodach jej oceny i postulowanych mechanizmach. W konkluzji, Autorka przytoczyła ogólnie przyjętą tezę, że niekontrolowane wolnorodnikowe utlenianie lipidów jest bardzo niepożądanym procesem prowadzącym do zmiany polarności cząsteczki lipidu, zaburzenia płynności i przepuszczalności warstwy fosfolipidowej, a w konsekwencji do śmierci komórek. Następnie został omówiony sposób działania antyoksydantów: prewencywnych i interwencywnych ze szczególnym uwzględnieniem antyoksydantów fenolowych takich jak: DL- α -tokoferol, kwercetyna, BHT (2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenol) i BHA (2-*tert*-butylo-4-metoksyfenol) oraz metod wyznaczania stopnia hamowania procesu autooksydacji. Wymienione fenole były głównym obiektem badań Autorki. Z uwagi na to, w części literaturowej znalazł się obszerny rozdział dotyczący ich aktywności antyoksydacyjnej,

reaktywności w stosunku do rodnika nadtlenkowego $\text{LOO}^\bullet$ oraz efektów stabilizujących rodnik semichinonowy oraz DL- α -tokoferoksylovyy. Następnie przedstawiono informacje dotyczące lokalizacji, ilości i dystrybucji antyoksydantów w układach dwufazowych (lipidowo-wodnych) przedstawiając hipotezę „pływających” w kierunku granicy faz rodników nadtlenkowych ($\text{LOO}^\bullet$). Szczegółowo omówiono dobrze znane z literatury mechanizmy działania antyoksydantów takie jak: HAT – (*hydrogen atom transfer*), PCET (*proton coupled electron transfer*), SPLET (*sequential proton loss electron transfer*) oraz KSE (*kinetic solvent effect*), jak też mechanizm synergistycznego działania antyoksydantów i metody jego ilościowego określania. W części poświęconej użytym materiałom i stosowanym metodom Autorka opisała metodologię wyznaczania takich parametrów jak: stałe dysocjacji polifenoli oraz szybkości ich reakcji z rodnikiem $\text{DPPH}^\bullet$, potencjał elektrooksydacyjny oraz współczynniki podziału między fazami heterogenicznymi.

Pragnę podkreślić, że osiągnięcie założonych celów było trudnym i złożonym zadaniem, gdyż każda z grup hydroksylowych w polifenolach w mniejszym lub większym stopniu wpływa na reaktywność całego układu, niejednokrotnie zmieniając znacząco stosunek udziału poszczególnych mechanizmów (HAT/PCET vs. SPLET) w całościowym mechanizmie działania antyoksydacyjnego. Przy czym istotnym jest, że mechanizmowi SPLET sprzyja wzrost kwasowości fenolu oraz rozpuszczalniki ułatwiające jonizacje. Biorąc powyższe pod uwagę Autorka musiała przeprowadzić bardzo systematycznie badania uzyskując dużą liczbę danych eksperymentalnych zarówno w układach homogenicznych jak i heterogenicznych. W efekcie analizy uzyskanych danych Autorka mogła pokusić się o sformułowanie zależnego od środowiska reakcji mechanizmu oddziaływania poszczególnych antyoksydantów fenolowych w układach homogenicznych, jak i heterogenicznych oraz określenie mechanizmu interakcji pomiędzy antyoksydantami fenolowymi. Do głównych osiągnięć Autorki należy zaliczyć wykazanie, że w przypadku reakcji silybinu, 2,3-dehydrosilybinu oraz luteiny z rodnikiem $\text{DPPH}^\bullet$ w układzie homogenicznym mechanizm procesu zależał głównie od polarności rozpuszczalnika. W niepolarnym dominował mechanizm HAT natomiast ze wzrostem polarności rozpuszczalnika, w mechanizmie całościowym zwiększał się udział mechanizmu typu SPLET. Co istotne, z uwagi na różną kwasowość poszczególnych grup hydroksylowych, zmiany te zachodziły w różnym stopniu dla każdej grupy hydroksylowej lub enolowej. W przypadku układów lipidowo-wodnych mechanizm działania badanych fenoli i polifenoli był różny i głównie zależał od budowy chemicznej antyoksydanta. Wykazano, że w flawonoidach mechanizm ich działania zależy głównie od stopnia dysocjacji grupy hydroksylowej w pozycji C-3 oraz pierwszej grupy fenolowej w katechinach. Ponadto Autorka określiła mechanizmy synergistycznego oddziaływania pomiędzy dwoma różnymi antyoksydantami fenolowymi. Wykazała, że dla efektywnego działania

synergistycznego istotna jest lokalizacja aktywniejszego antyoksydanta w układzie dwufazowym. Ponadto dla osiągnięcia lepszego efektu synergistycznego aktywniejszy antyoksydant powinien być silnie hydrofobowy. Natomiast w przypadku mniej aktywnego antyoksydanta najistotniejszym czynnikiem wydaje się być kinetyka dysocjacji grupy hydroksylowej niż inne efekty wynikające z jego dystrybucji. Spośród innych osiągnięć Autorki należy wymienić opracowanie nowej metody ilościowego szacowania efektu synergistycznego w oparciu o takie parametry jak: czas aktywności antyoksydanta oraz jego efektywność w zmiataniu rodników nadtlenkowych (LOO[•]), jak też, opracowanie nowego bardziej czytelnego sposobu przedstawiania wyników synergistycznego działania antyoksydantów poprzez opracowanie odpowiednich map pozwalających na szybkie wybranie odpowiedniej warunków synergii między antyoksydantami.

Na podstawie przedstawionych w tej części pracy rezultatów oraz wyciągniętych wniosków uważam, że Autorka z powodzeniem zrealizowała założone na wstępie pracy cele. Niestety w pracy Autorka nie zamieściła informacji dotyczących swojego dorobku naukowego, dlatego trudno mi jest ocenić ten aspekt działalności naukowej mgr. Eweliny van Venum. Przypuszczalnie większość wyników zawartych w dysertacji jest na etapie przygotowywania do druku lub zostały wysłane do recenzji.

Na uwagę zasługuje strona edytorska rozprawy. Błędy literowe są nieliczne, praktycznie nie pojawiają się tego typu uchybienia. Nieścisłości, które udało mi się dostrzec, nie wpływają na wartość merytoryczną pracy i nie warto poświęcać im czasu. Tekst czyta się dobrze, choć zdarzają się nieco zagmatwane fragmenty, wymagające chwili skupienia do pełnego zrozumienia toku myśli Autorki.

Z obowiązku recenzenta zamieszczam poniżej kilka drobnych uwag dotyczących pracy:

Str. 18. Rysunek 2.8, przedstawione struktury rezonansowe byłyby bardziej czytelne, gdyby zastosowano strzałki z grotami dla zilustrowania przemieszczających się par elektronowych. Chciałem zauważyć, że identyczny rysunek nie występuje w pracy M. Foti (lit., 86), zatem nie jest to reprodukcja?

Str. 19. Rysunek 2.9 zaczerpnięto dokładnie z pracy L. Valgimigli (lit., 88) zatem w podpisie powinno być „reproduced from ref. 88”

Str. 34 i 35. W strukturach chemicznych zawierających centra stereogeniczne należałoby zaznaczyć, czy mamy do czynienia z mieszaniną racemiczną czy czystym izomerem (np.; *R/S*-Trolox).

Str. 35. Silybin pozyskiwany jest z nasion ostropestu plamistego i jest to mieszanina dwóch izomerów (1: 1) różniących się konfiguracją na centrach stereogenicznych C-10 i C-11. W pracy, do celów syntetycznych, najprawdopodobniej użyto produkt firmy Sigma-Aldrich o nazwie Silibinin (CAS No. 22888-70-6, Choć nazwa ta nie jest zalecana). W rzeczywistości jest to mieszanina dwóch związków silybin A (10*R*,11*R*) oraz silybin B (10*S* i 11*S*). Umieszczenie tych informacji na strukturach

uprościłoby zrozumienie przyjętego sposobu opisu widm ^1H NMR 2,3-dehydrosilybinu. Bez informacji, że mamy do czynienia z widmem mieszaniny diastereoizomerów oznaczenie H-23(1) i H-23(2) jest nie zrozumiałe. Ponadto opis spektroskopowy byłby czytelniejszy, gdyby był poprzedzony rysunkiem przedstawiającym sposób numerowania atomów węgla w cząsteczce 2,3 dehydrosilybinu.

Str. 35. W jakim celu w nawiasie umieszczono akronim (COSY)?

Przedstawione uwagi nie wpływają na moją wysoką ocenę recenzowanej pracy. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania zwyczajowe i wymogi obowiązującej ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym. Z pełnym przekonaniem składam do Rady Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego wniosek o dopuszczenie mgr. Eweliny van Wenum do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Piotr Wtępiła