



**AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE**

**AGH UNIVERSITY OF SCIENCE
AND TECHNOLOGY**

Seminarium Wydziałowe, 12.01.2024

Surowce naturalne źródłem nowych związków przeciwutleniających

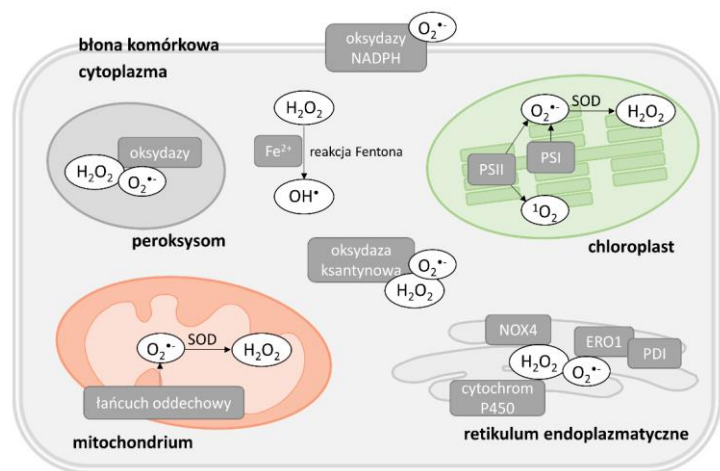
Agnieszka Trela-Makowej

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej, AGH

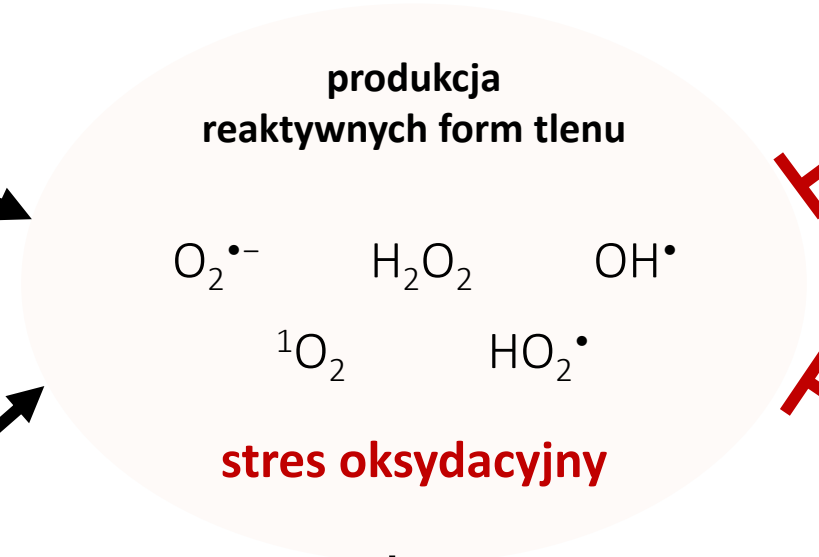
Plan prezentacji

1. Wprowadzenie
 - a. antyoksydanty
 - b. lipidy prenylowe
 - c. aminy biogenne
2. Motywacja i cel podjęcia prezentowanej tematyki badań
3. Analiza materiału roślinnego pod kątem identyfikacji nowych lipidów prenylowych oraz innych związków antyoksydacyjnych
4. Identyfikacja masowa oraz strukturalna nowo wyizolowanych związków
5. Charakterystyka funkcjonalna pozyskanych związków
 - a. właściwości antyoksydacyjne
 - b. działanie neuroprotekcyjne
6. Podsumowanie

Antyoksydanty

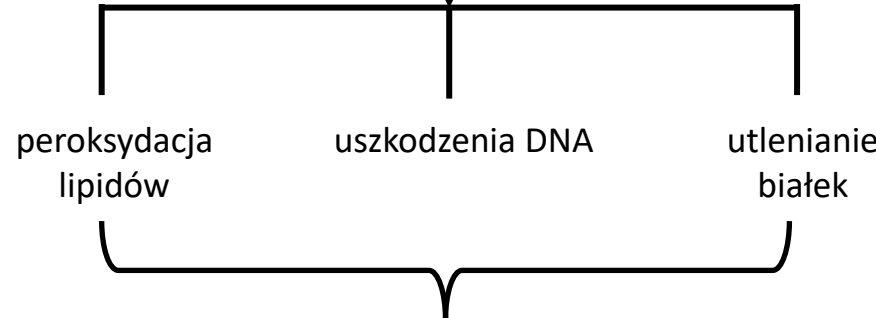


- czynniki zewnętrzne, np.**
- promieniowanie jonizujące
 - promieniowanie UV
 - zanieczyszczenia powietrza



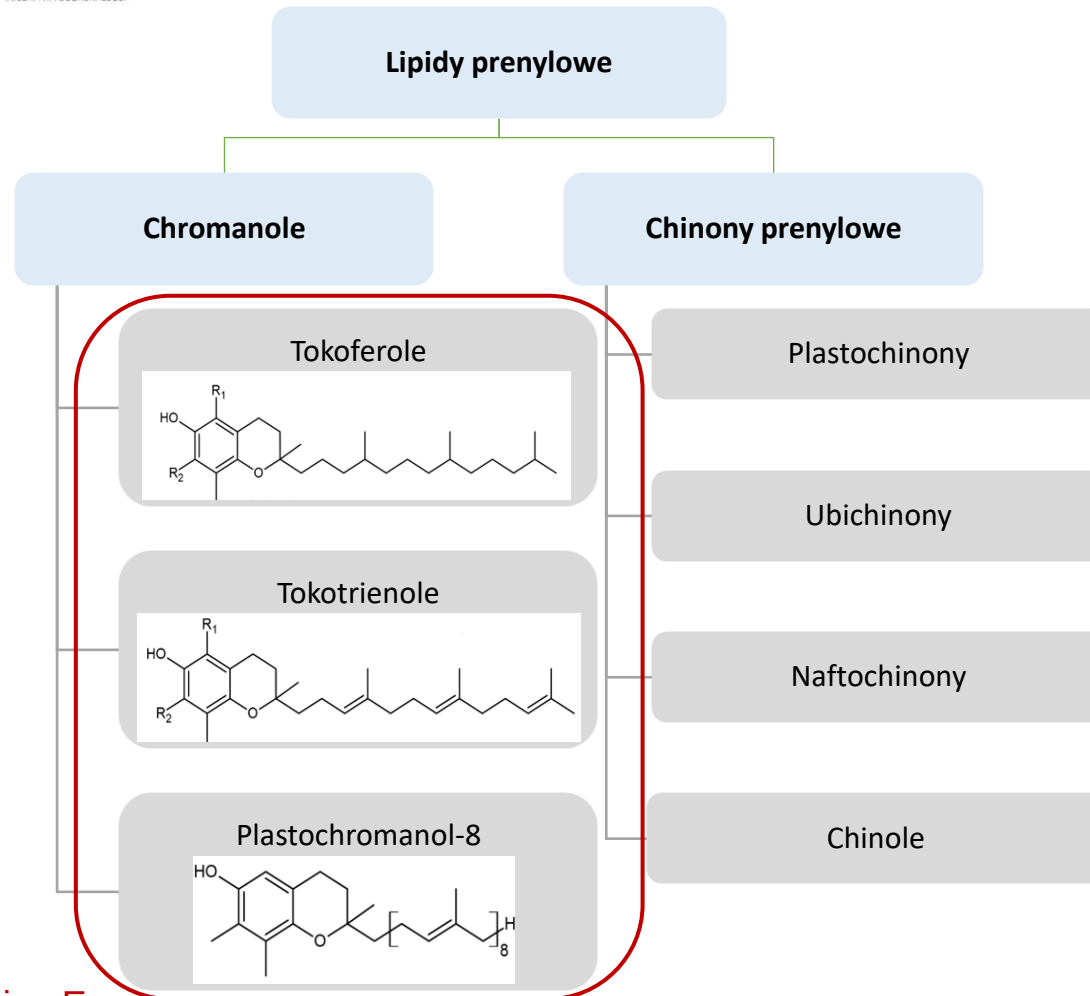
- antyoksydanty enzymatyczne**
- katalaza
 - peroksydazy
 - dysmutaza ponadtlenkowa

- antyoksydanty nieenzymatyczne**
- hydrofilowe:**
- witamina C
 - polifenole
 - flawonoidy
- hydrofobowe:**
- karotenoidy
 - **lipidy prenylowe, np. witamina E (tokochromanole)**
 - niektóre aminy biogenne, np. **serotonina i jej N-acylowe pochodne**



choroby, procesy starzenia

Lipidy prenylowe

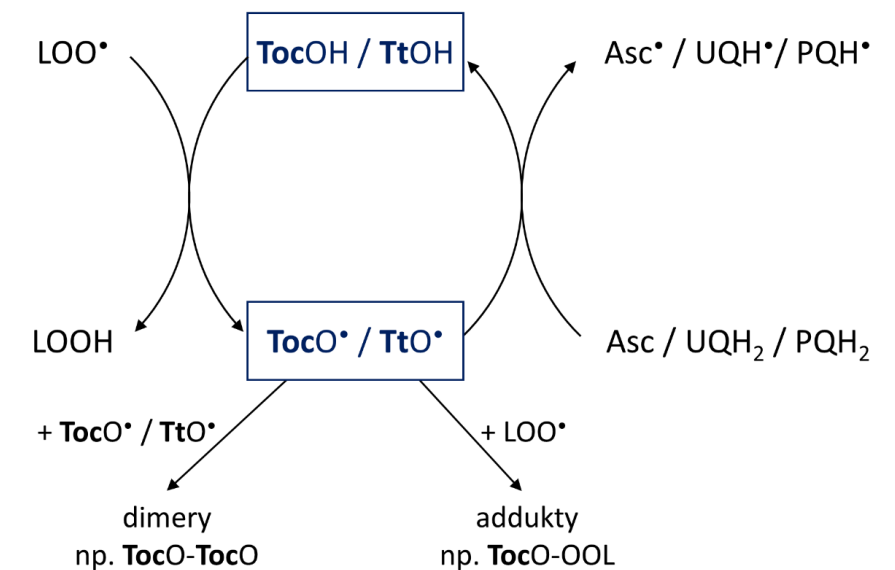


Witamina E

Tokoferol/ Tokotrienol	Pozycja w pierścieniu	
	R ₁	R ₂
α	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H
γ	H	CH ₃
δ	H	H

- silne antyoksydanty (chromanole)

1) przerywanie łańcuchowej reakcji peroksydacji lipidów

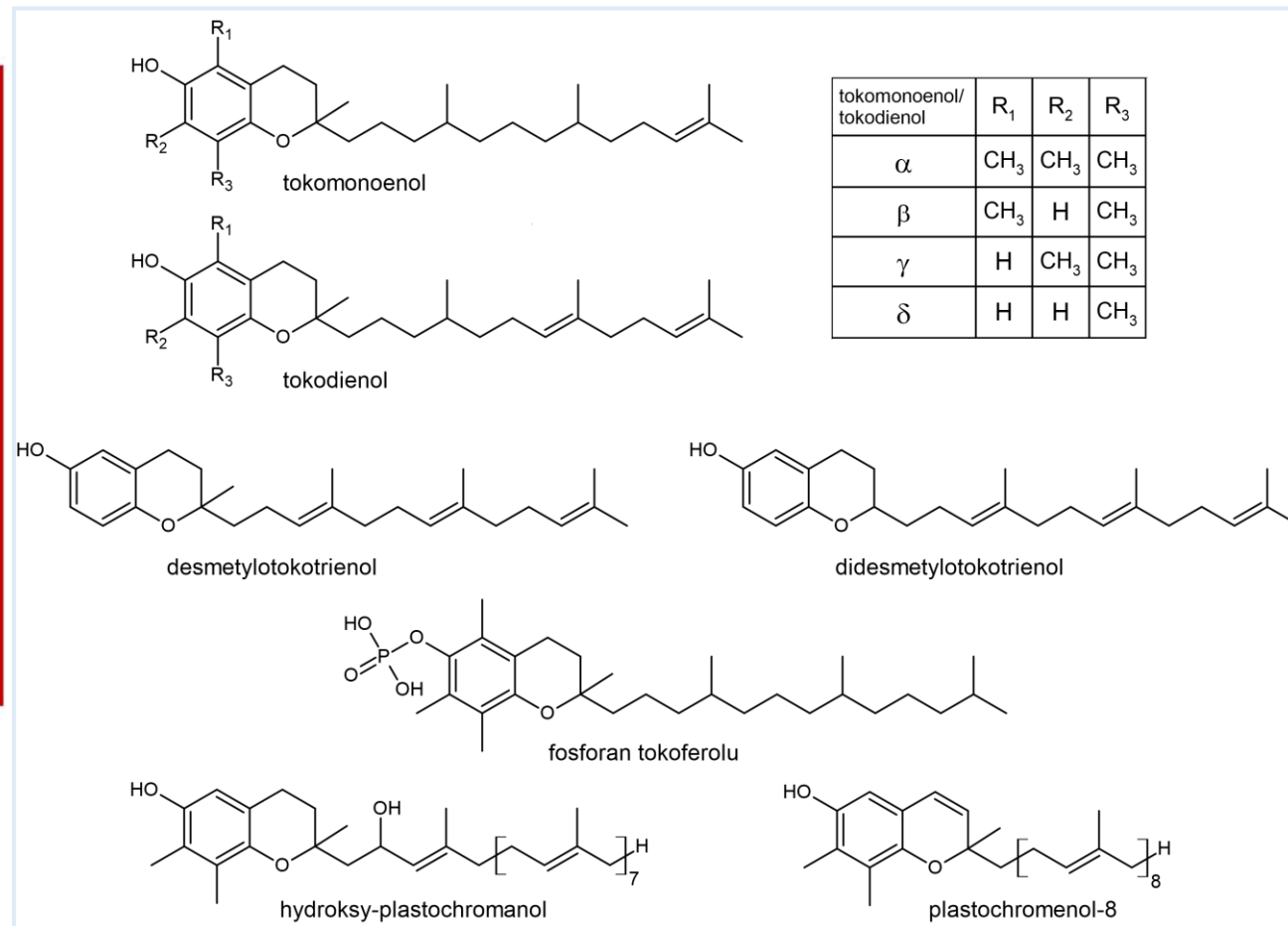


2) neutralizowanie $^1\text{O}_2$

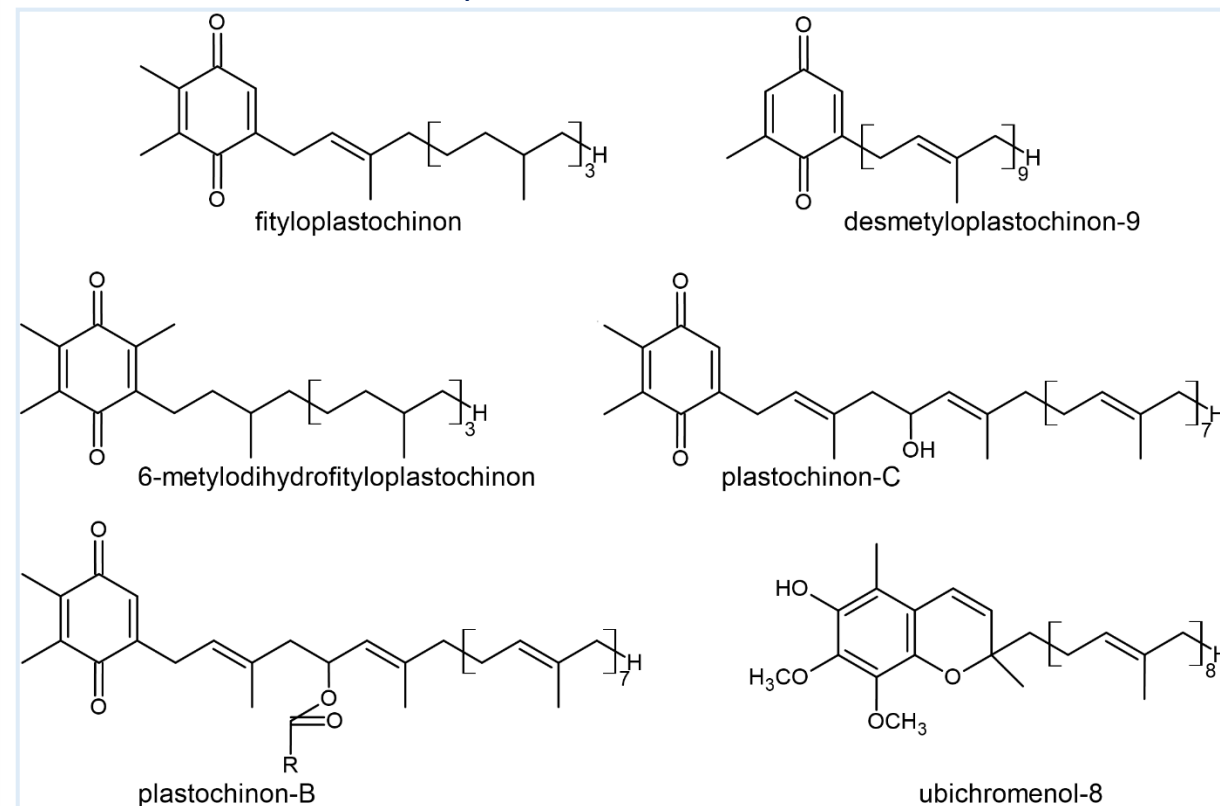
- udział w fotosyntetycznym i oddechowym łańcuchu transportu elektronów (chinony)

Nietypowe pochodne lipidów prenylowych

pochodne chromanoli



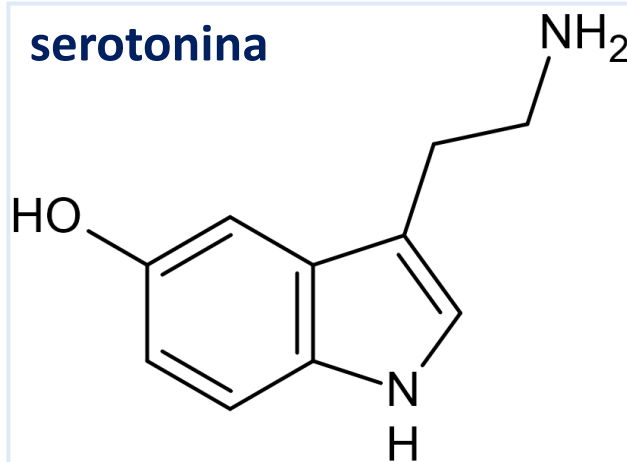
pochodne chinonów



- występowanie ograniczone do niektórych gatunków i organów roślinnych
- biosynteza i/lub funkcje biologiczne wielu z nich pozostają niewyjaśnione
- niektóre rzadsze pochodne wykazują silniejszą/szerszą aktywność biologiczną niż powszechne odpowiedniki

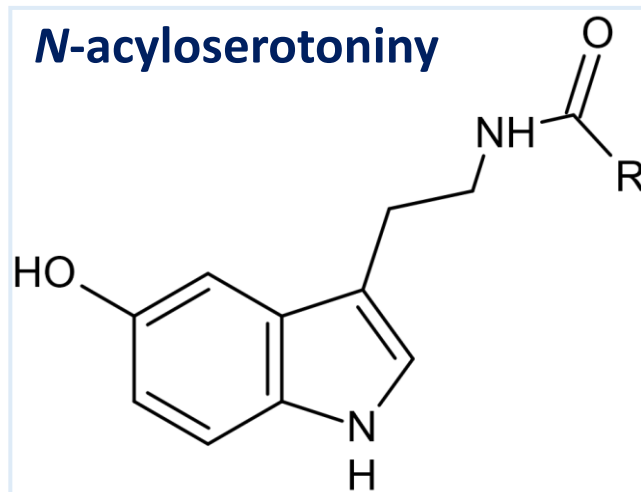
Aminy biogenne

serotonina



- u ssaków jest dobrze poznany neuroprzekaźnikiem
- pełni liczne funkcje fizjologiczne u roślin
- wykazuje działanie antyoksydacyjne (wymiana RFT, posiada zdolność chelatowania Fe^{2+} , chroni lipidy błon biologicznych przed peroksydacją)

N-acyloserotoniny



- wykryte w przewodzie pokarmowym zwierząt na bardzo niskim poziomie
- dane wskazujące na ich działanie przeciwbólowe, przeciwzapalne, neuroprotekcyjne, immunomodulujące
- doniesienia o aktywności antyoksydacyjnej
- brak danych o występowaniu tych związków u roślin

Motywacja podjęcia tematyki i cele badań

MOTYWACJA

- Antyoksydanty są szeroko stosowane w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym.
- Powszechnie stosowane w licznych produktach są antyoksydanty syntetyczne, np. BHA, BHT, jednak badania ostatnich lat wskazują na ich szkodliwość.
- Współczesne trendy poszukiwań bezpiecznych antyoksydantów skupiają się na pozyskiwaniu ich z naturalnych źródeł.
- Dane literaturowe wskazują, że różne gatunki roślin mogą zawierać w swym składzie rzadkie, bądź nietypowe związki antyoksydacyjne.



CELE

1) Analiza materiału roślinnego

- pod kątem występowania nowych antyoksydantów
- pod kątem dystrybucji tokochochromanoli

2) Charakterystyka strukturalna nowych związków

- z oleju z nasion baobabu (*Adansonia digitata*)
- z nasion cytryny (*Citrus limon*) i innych cytrusów

3) Charakterystyka funkcjonalna nowych związków oraz tokochochromanoli

- właściwości antyoksydacyjne
- działanie neuroprotekcyjne

CZĘŚĆ I

Analiza materiału roślinnego

Materiał do badań

Oleje roślinne:

Adansonia digitata
Amaranthus cruentus
Anethum graveolens
Argania spinosa
Azadirachta indica
Borago officinalis
Brassica napus
Calophyllum inophyllum
Camellia japonica
Camelina sativa
Cannabis sativa
Capsicum annuum
Caryodendron orinocense
Cerasus vulgaris
Citrullus lanatus
Citrus limon

Coffea arabica
Coriandrum sativum
Corylus avellana
Cucurbita pepo
Daucus carota sativa
Fragaria ananassa
Laurus nobilis
Linum usitatissimum
Macadamia ternifolia
Moringa oleifera
Nigella sativa
Opuntia ficus-indica
Oryza sativa
Papaver somniferum
Persea americana
Petroselinum crispum

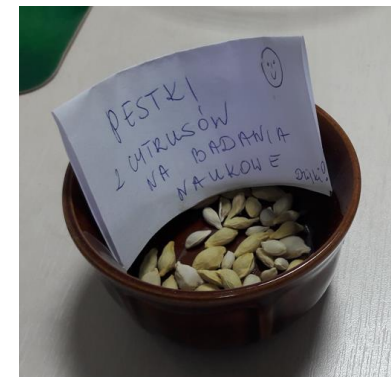
Pistacia vera
Plukenetia volubilis
Prunus armeniaca
Prunus domestica
Punica granatum
Ribes nigrum
Ricinus communis
Rosa canina
Rubus idaeus
Salvia hispanica
Sclerocarya birrea
Sesamum indicum
Simmondsia chinensis
Solanum lycopersicum
Triticum vulgare
Zea mays

Nasiona:

Adansonia digitata
Aframomum melegueta
Capsicum annuum
Citrus limon
Citrus maxima
Citrus paradisi

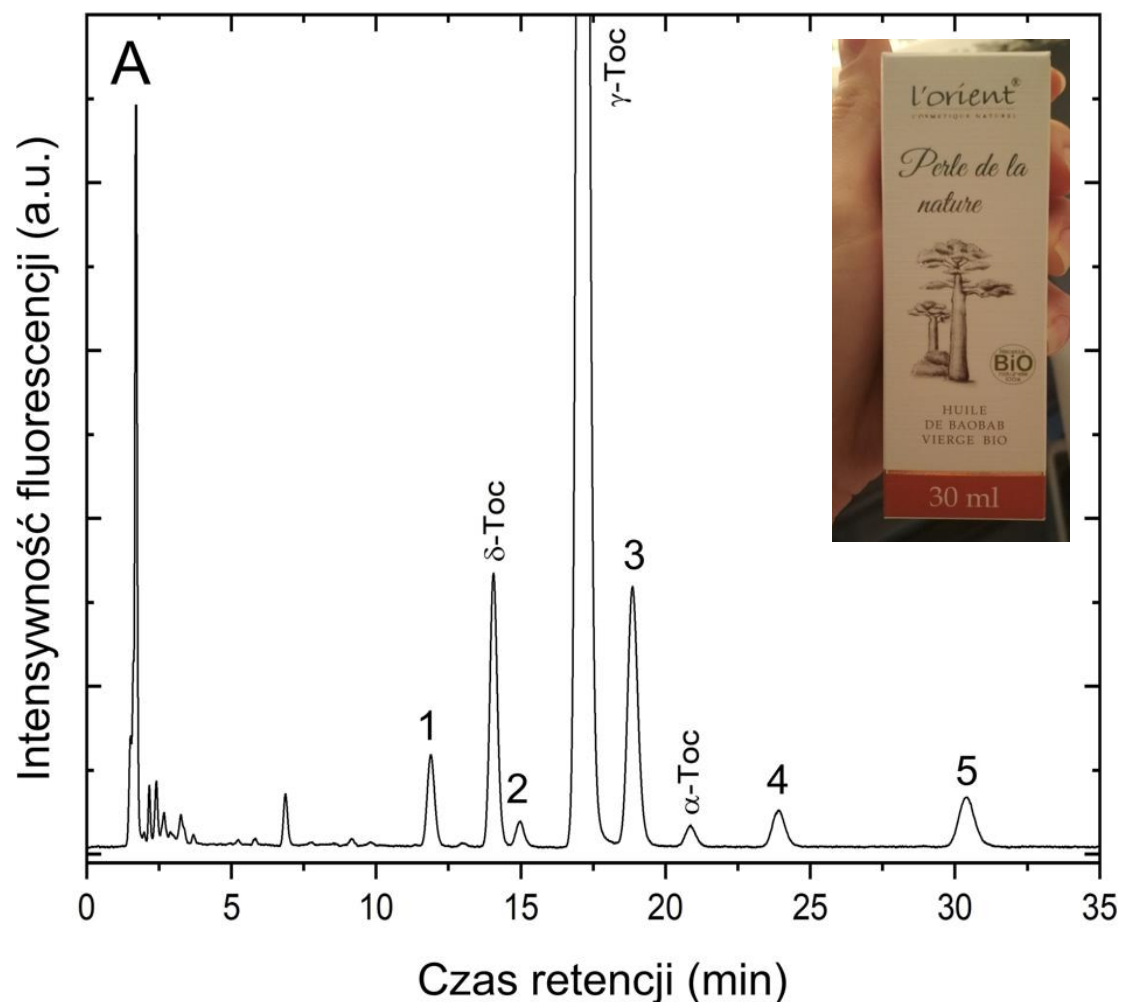
Citrus reticulata
Coffea arabica
Linum usitatissimum
 (26 genotypów)
Prunus domestica
Malus domestica

Inne: **liście, korzenie, kwiaty, owoce, siewki**

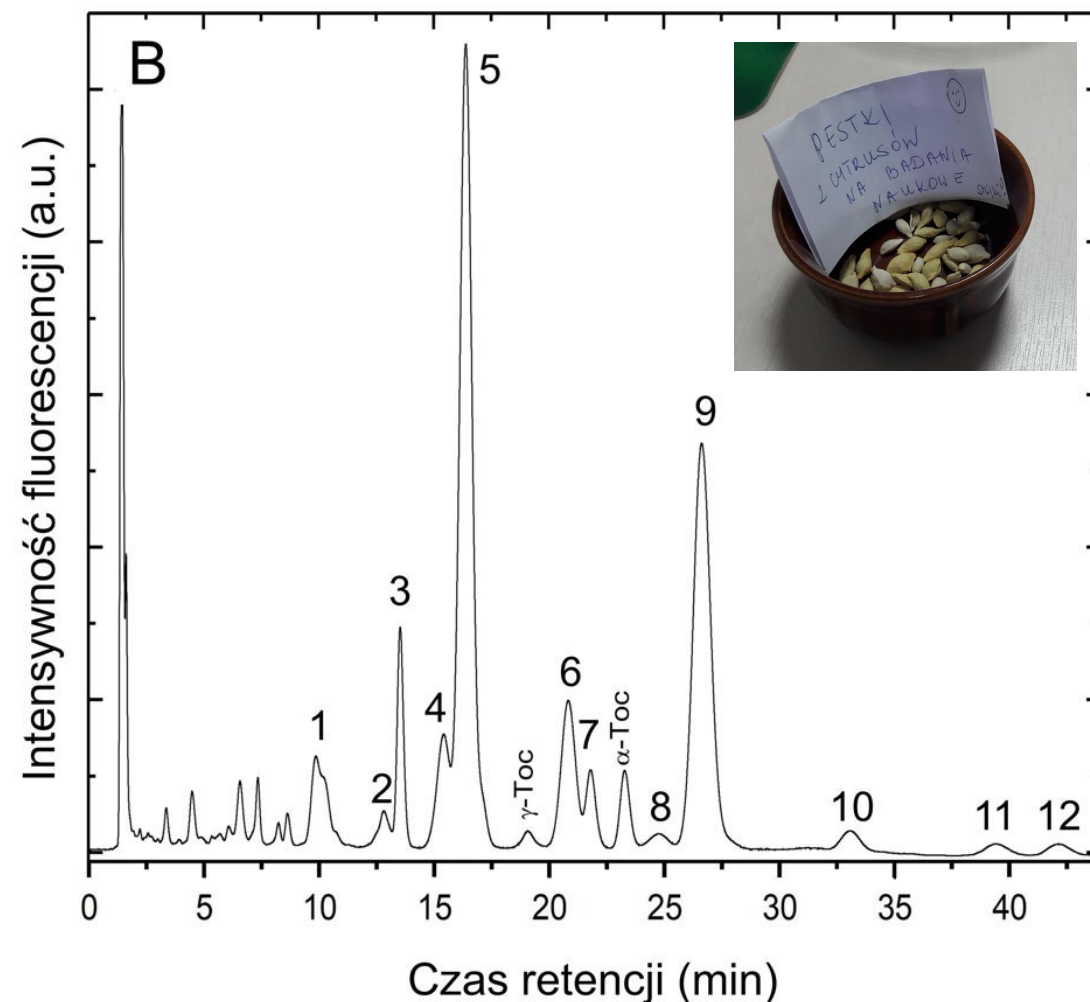


Występowanie nowych antyoksydantów

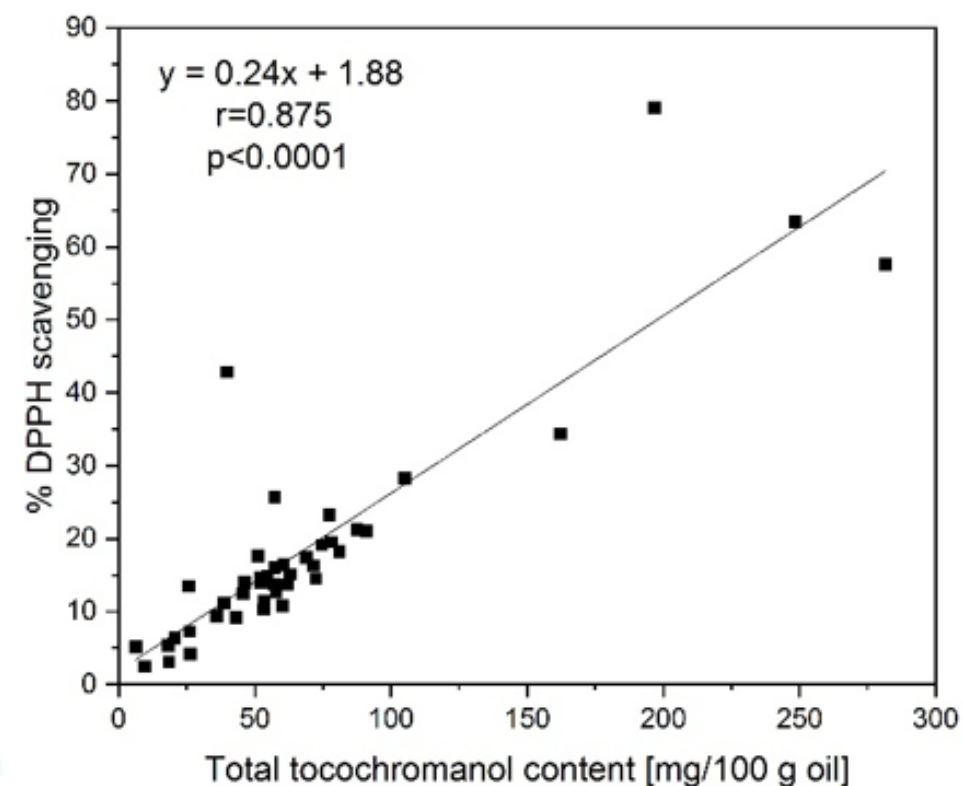
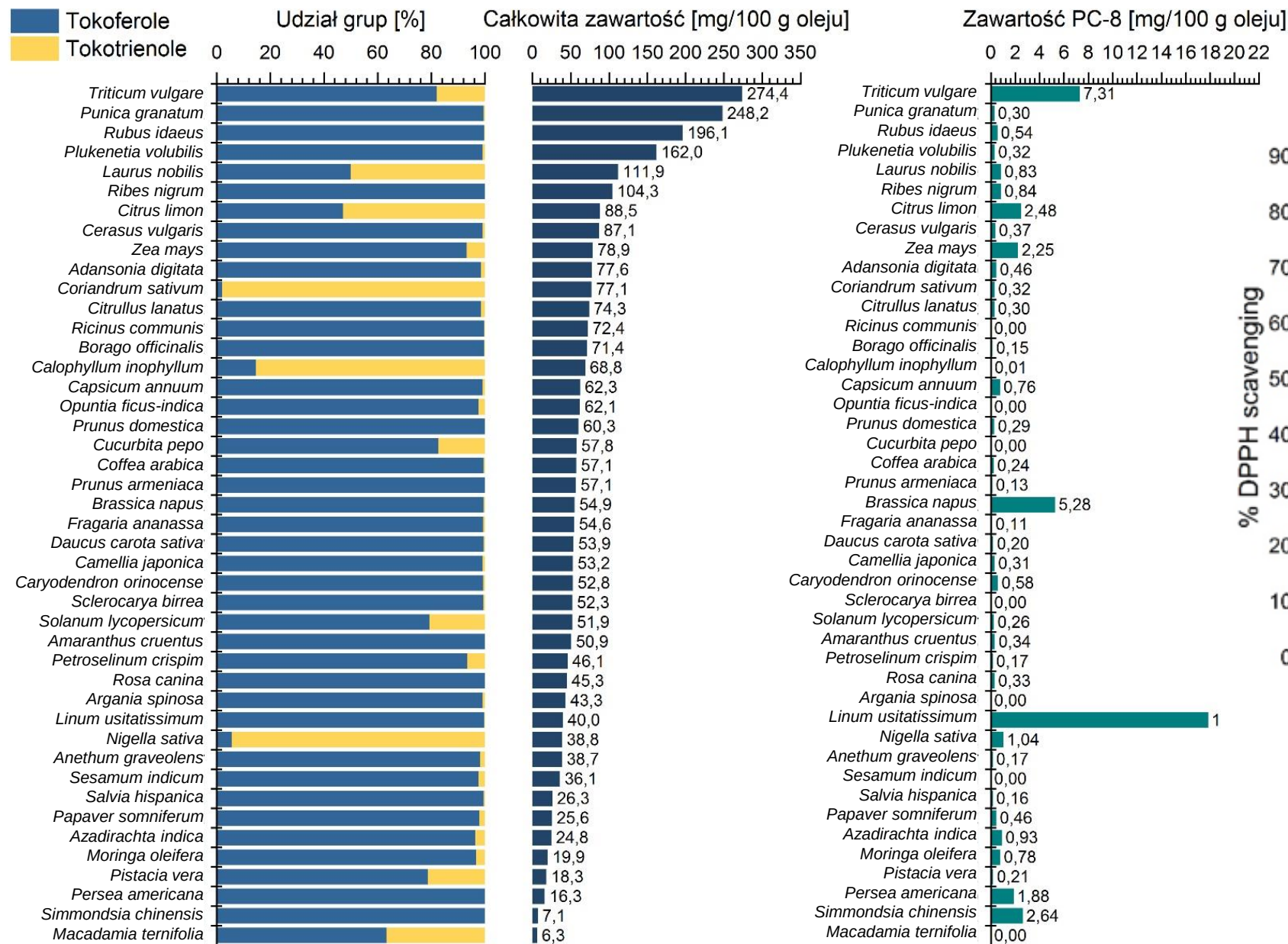
ekstrakt z oleju z nasion baobabu



ekstrakt z pestek cytryny



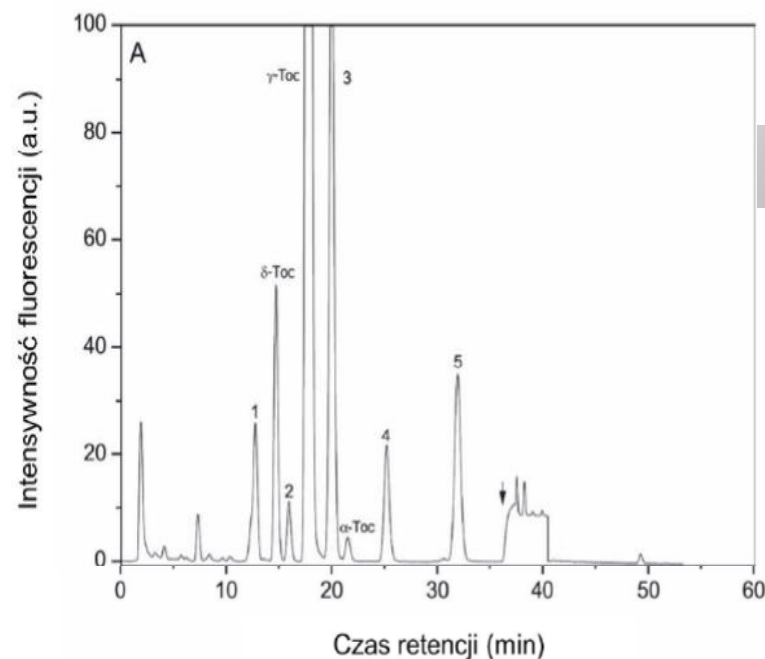
Dystrybucja tokochoromanoli



CZĘŚĆ II

Charakterystyka strukturalna nowych związków

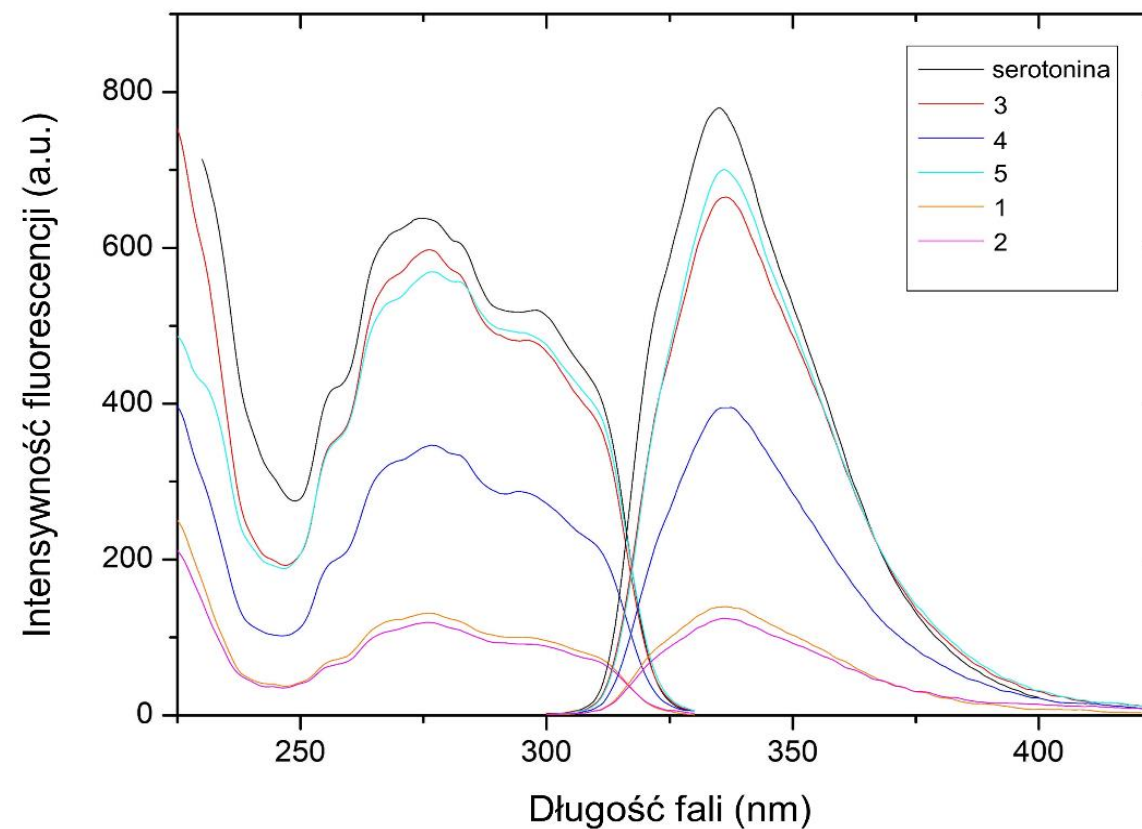
Związki z oleju z nasion baobabu



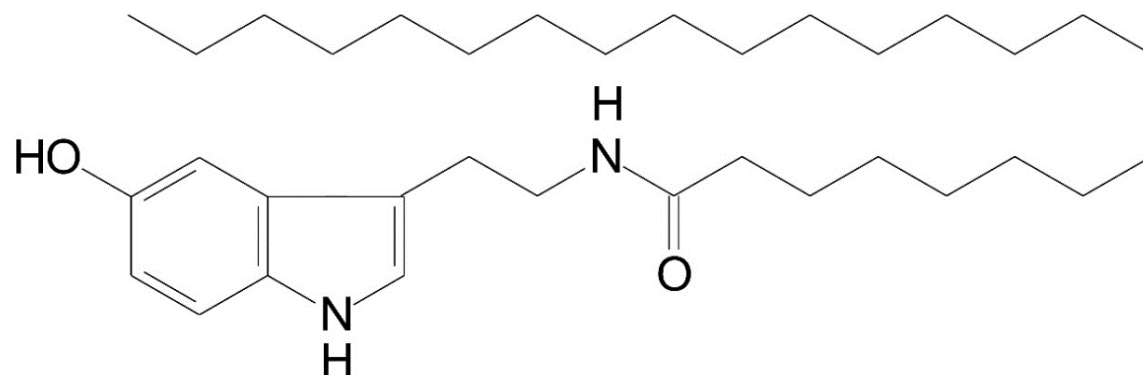
preparatywna izolacja
oraz oczyszczanie
nieznanych związków

uzyskanie pięciu
oczyszczonych
związków

analiza masowa
i strukturalna
związków 1-5

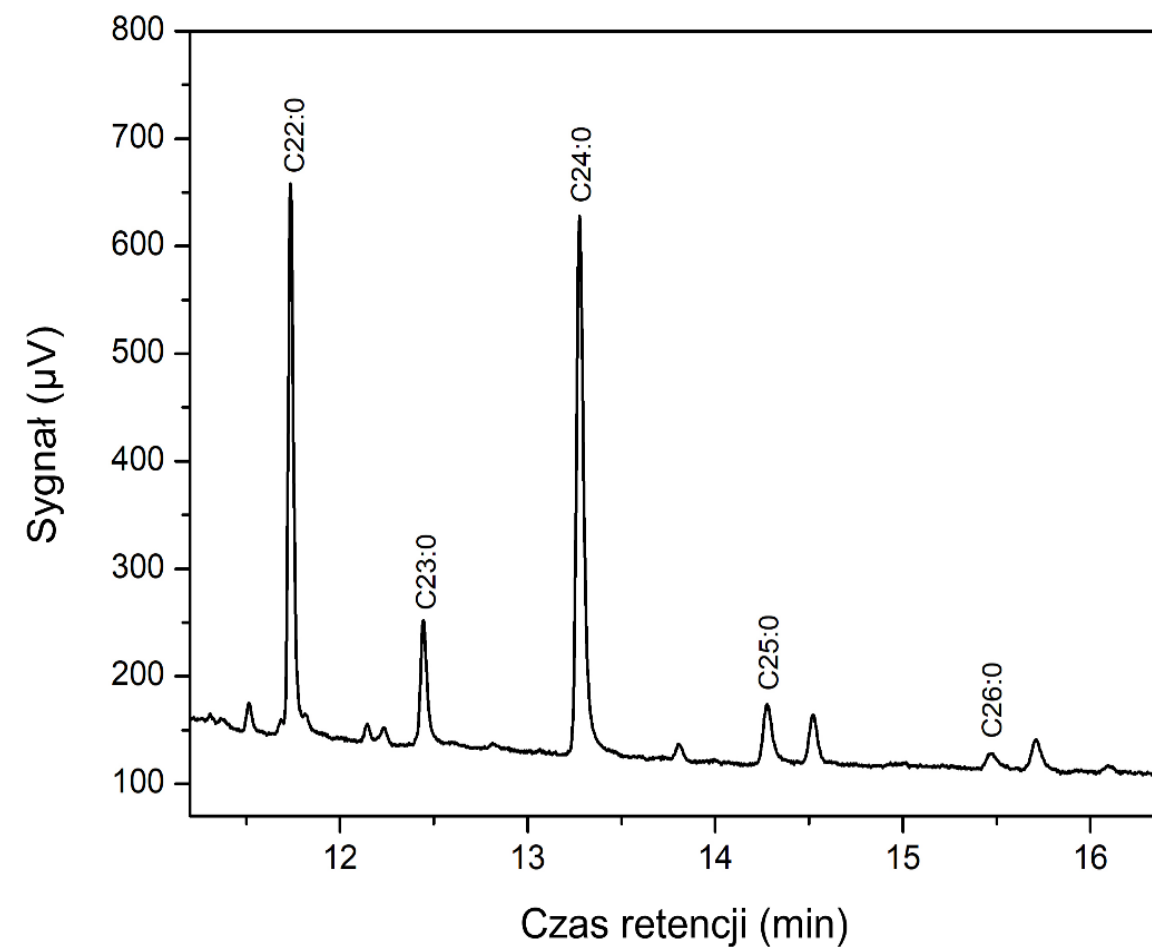


Związki z oleju z nasion baobabu



N-lignoceryloxyserotonina (C24-serotonina)

Numer piku	HR-MS (m/z)	Struktura molekularna	Dokładna masa	Δ (mDa)	Proponowana struktura
1	537,4047	$C_{32}H_{54}N_2O_3Na^+$	537,4032	1,49	C22-serotonina
2	535,4239	$C_{33}H_{56}N_2O_2Na^+$	535,4239	0	C23-serotonina
3	549,4514	$C_{34}H_{58}N_2O_2Na^+$	549,4396	11,8	C24-serotonina
4	563,4662	$C_{35}H_{60}N_2O_2Na^+$	563,4552	10,95	C25-serotonina
5	577,4684	$C_{36}H_{62}N_2O_2Na^+$	577,4710	2,5	C26-serotonina



Związki z oleju z nasion baobabu

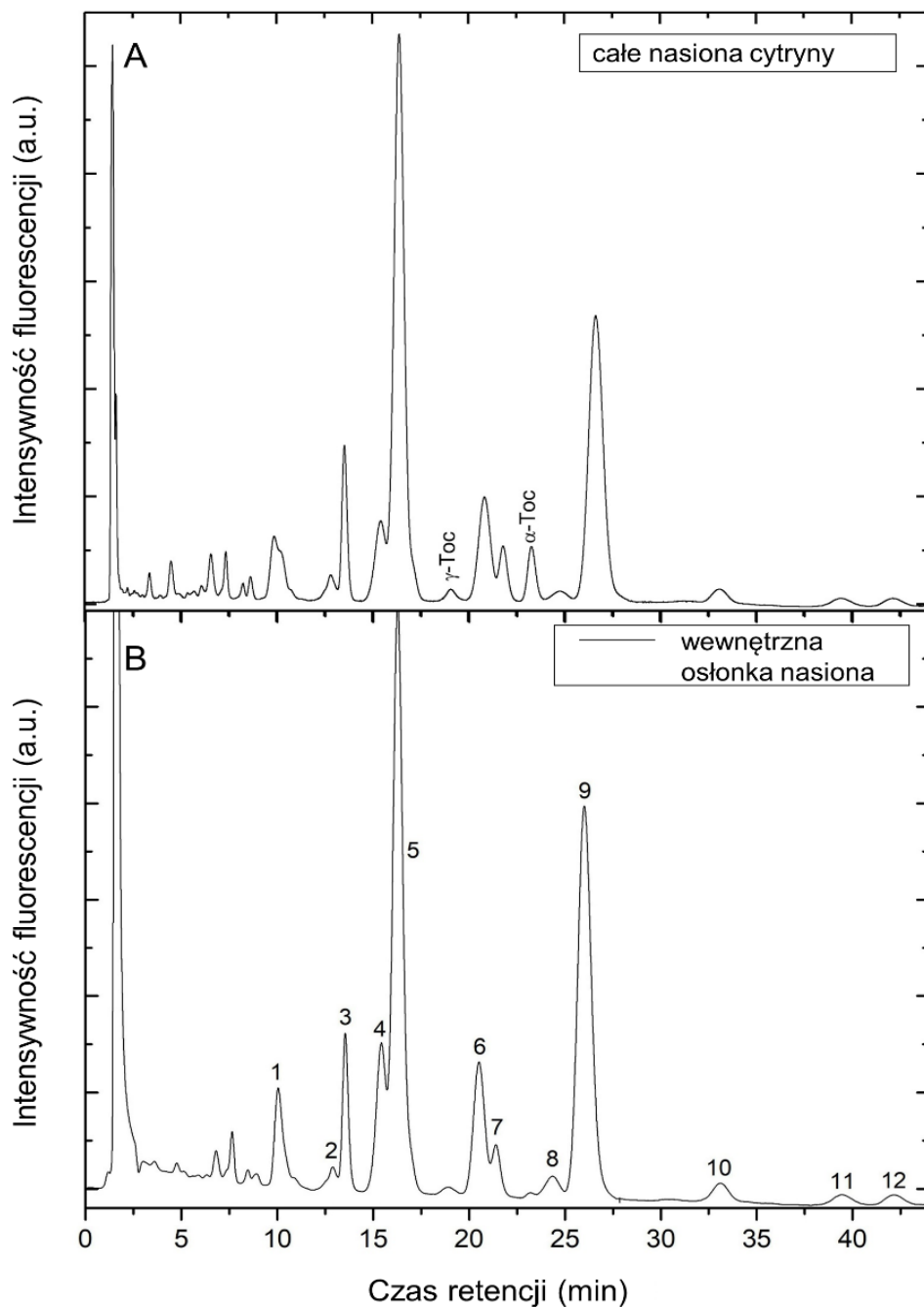
N-acyloserotonina	Udział procentowy (%)
C22	2,90
C23	2,63
C24	59,0
C25	13,5
C26	20,1
C27	0,92
C28	0,73
C29	0,081
C30	0,119
C31	0,009
C32	0,006

Organ roślinny/próbka	C24-ser/ γ -Toc (mol%)
olej z nasion („L'orient”)	18,73 $\pm$ 0,21
nasiona	61,5
liścienie (6 tygodniowe*)	1,41 $\pm$ 0,04
liście właściwe młodociane (3 miesięczne)	0
liście właściwe dojrzałe (3 miesięczne)	0
liście właściwe (6,5 miesięczne)	0
korzenie (8 miesięczne)	0

* podany wiek dotyczy wieku rośliny od wysiewu nasion

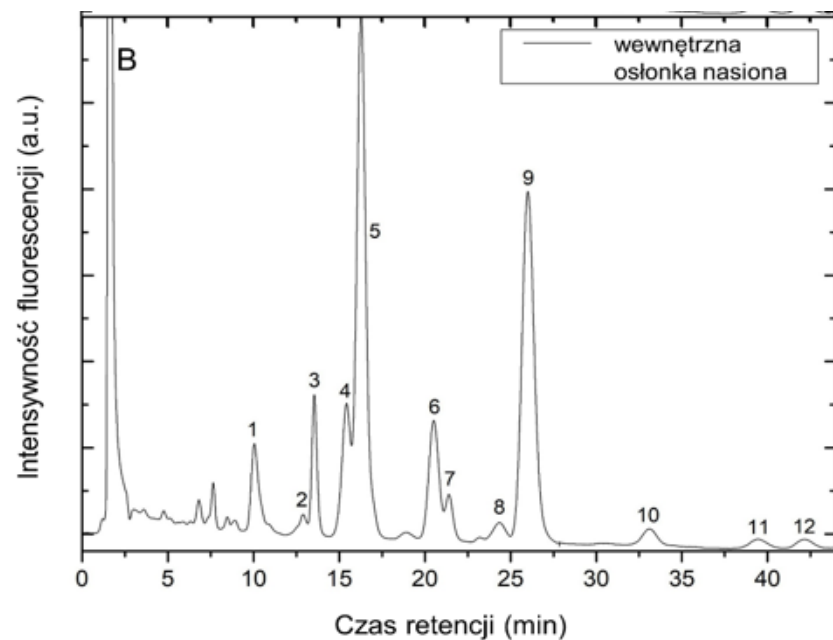


Związki z nasion cytryny



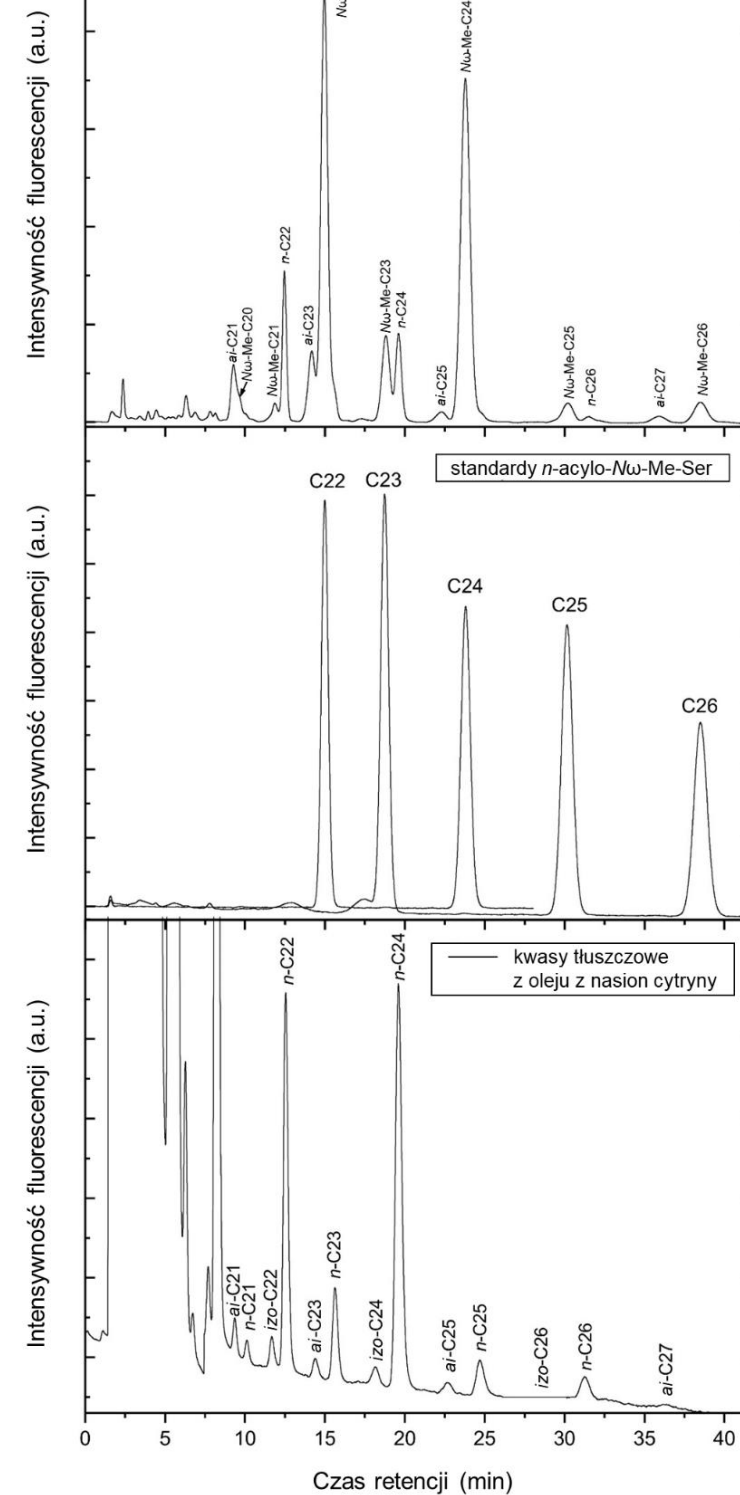
Numer piku	HR-MS (m/z)	Struktura molekularna	Dokładna masa	Δ (mDa)	Proponowana struktura
1	507,3921	$C_{31}H_{52}N_2O_2Na^+$	507,3921	0,0	C21-serotonina
2	521,4081	$C_{32}H_{54}N_2O_2Na^+$	521,4078	0,3	C22-serotonina
3	521,4073	$C_{32}H_{54}N_2O_2Na^+$	521,4078	0,5	C22-serotonina
4	535,4235	$C_{33}H_{56}N_2O_2Na^+$	535,4234	0,1	C23-serotonina
5	535,4227	$C_{33}H_{56}N_2O_2Na^+$	535,4234	0,7	C23-serotonina
6	549,4384	$C_{34}H_{58}N_2O_2Na^+$	549,4391	0,7	C24-serotonina
7	549,4386	$C_{34}H_{58}N_2O_2Na^+$	549,4391	0,5	C24-serotonina
8	563,4563	$C_{35}H_{60}N_2O_2Na^+$	563,4547	1,6	C25-serotonina
9	563,4557	$C_{35}H_{60}N_2O_2Na^+$	563,4547	1,0	C25-serotonina
10	577,4699	$C_{36}H_{62}N_2O_2Na^+$	577,4704	0,5	C26-serotonina
11	591,4872	$C_{37}H_{64}N_2O_2Na^+$	591,4860	1,2	C27-serotonina
12	591,4857	$C_{37}H_{64}N_2O_2Na^+$	591,4860	0,3	C27-serotonina

Związki z nasion cytryny



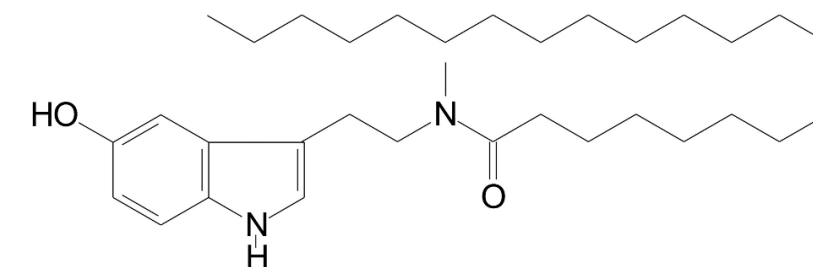
synteza *N*-acyloserotonin i
identyfikacja związków

hydroliza próbki oleju
z nasion cytryny

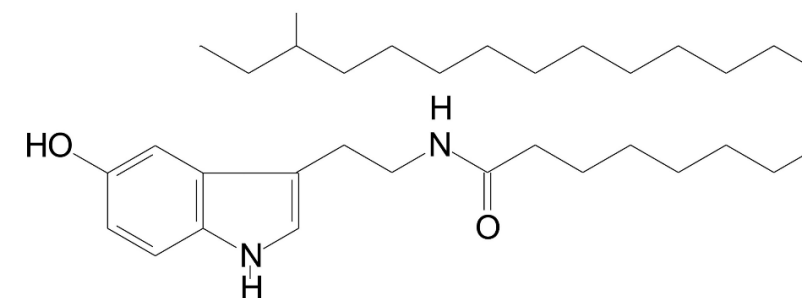


Związki z nasion cytryny

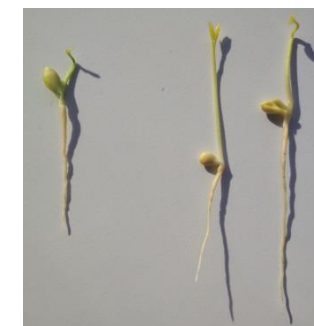
N-acyloserotoniny	Cytryna	Mandarynka	Grejpfrut	Pomelo
<C21	2,3	2,7	2,8	2,1
ai-C21	3,3	1,3	1,3	1,5
Me-C20	2,2	1,1	1,0	-
n-C21	-	0,1	-	0,1
Me-C21	1,1	0,6	0,7	0,3
n-C22	6,0	3,3	4,1	18,5
ai-C23	5,8	3,6	3,1	-
Me-C22	38,6	40,5	36,1	14,6
n-C23	-	-	1,1	6,8
Me-ai-C23	0,2	-	-	-
Me-C23	7,1	9,7	9,8	6,0
n-C24	2,8	4,3	3,7	21,8
ai-C25	0,8	-	0,9	-
Me-C24	26,8	29,0	30,5	22,5
n-C25	-	-	1,1	2,1
izo-C26	-	-	-	-
Me-C25	1,1	3,1	2,6	1,3
n-C26	-	0,5	0,3	1,0
ai-C27	1,0	-	0,8	1,3
Me-C26	0,9	-	-	-
całkowita zawartość acylo-Me-Ser (%)	77,8	83,0	81,6	44,7
całkowita zawartość n-acylo-Ser (%)	8,8	8,2	10,3	50,3



n-behenylo-*N*ω-metyloserotonina (*n*-C22-metyloserotonina)



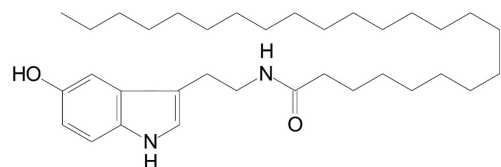
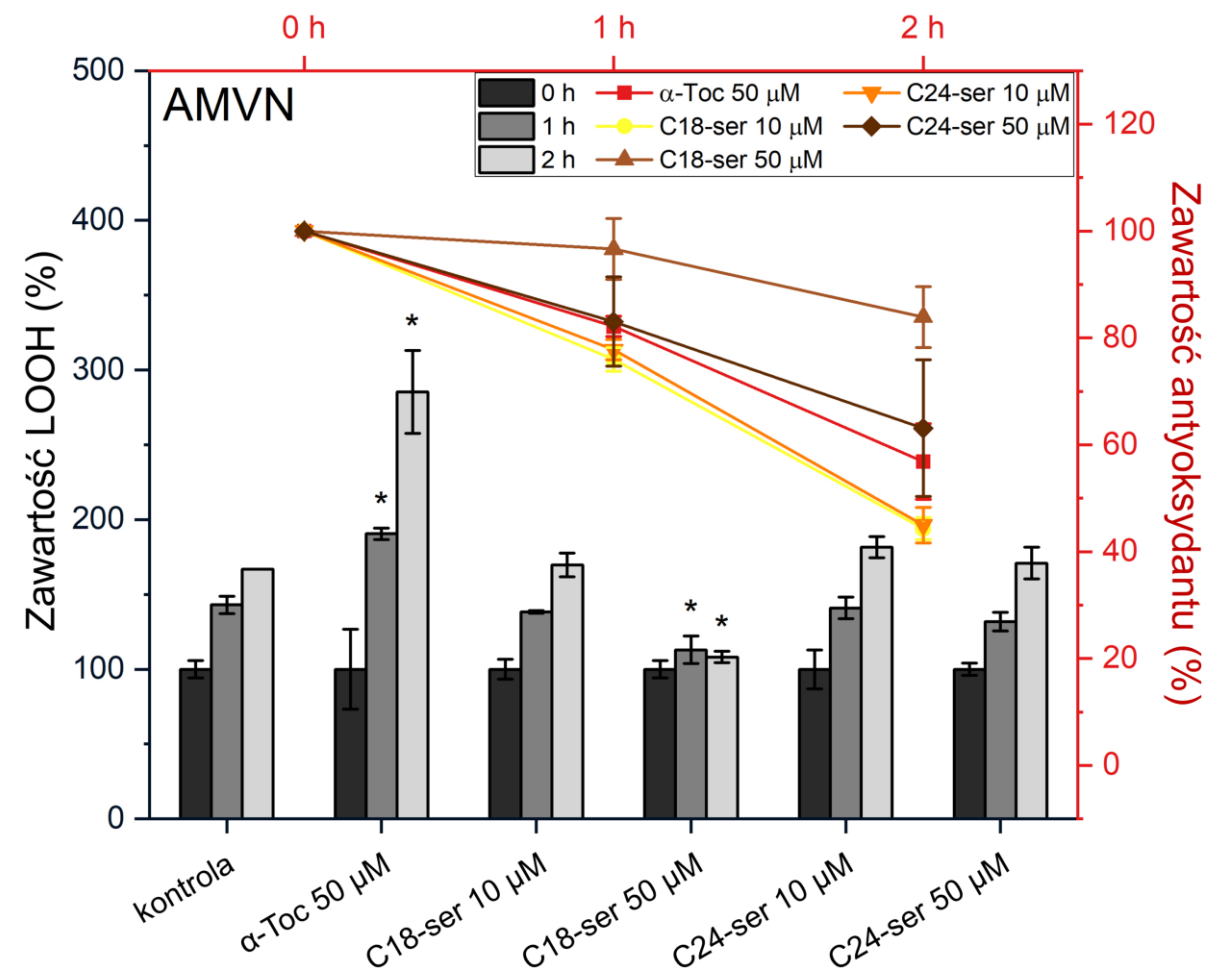
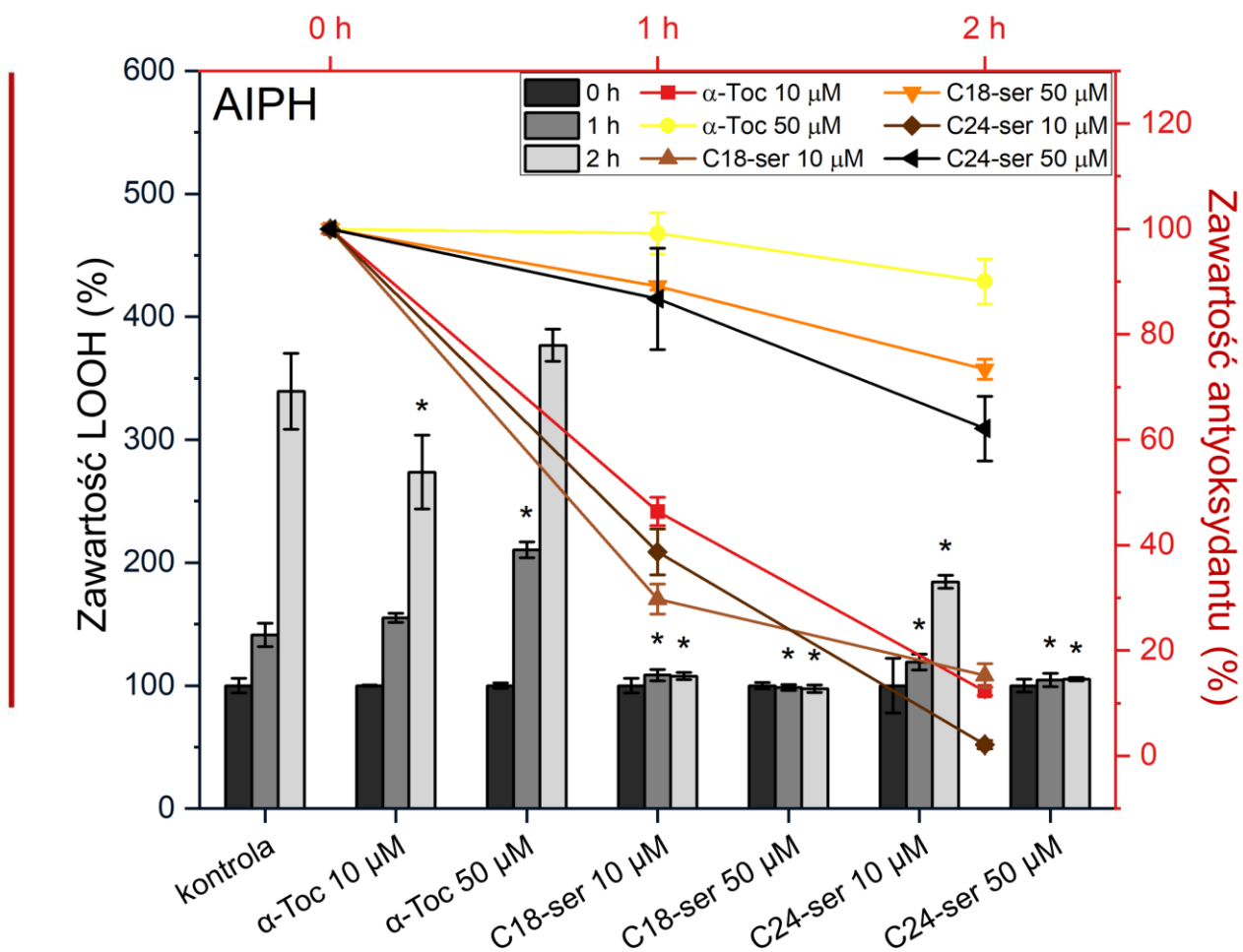
anteizo-C23-serotonina



CZĘŚĆ III

Charakterystyka funkcjonalna nowych związków i tokochromanoli

Aktywność antyoksydacyjna

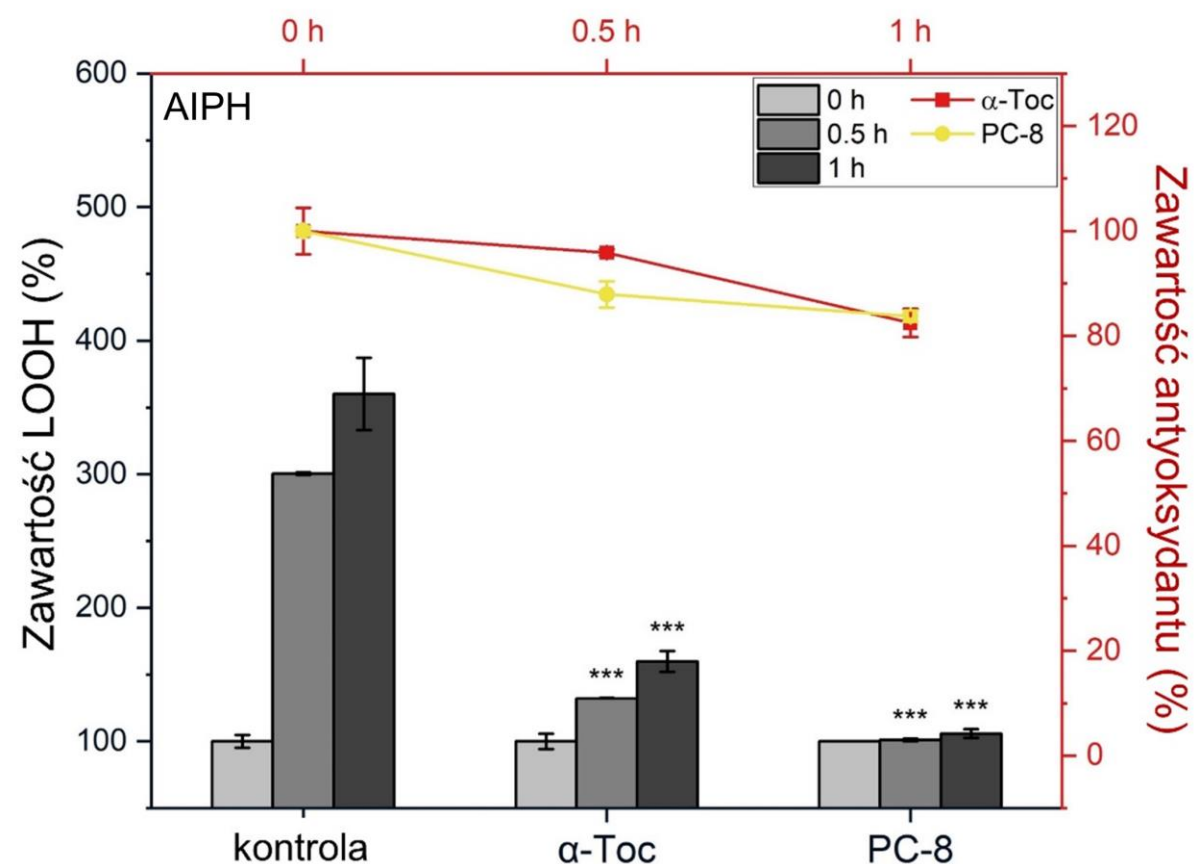
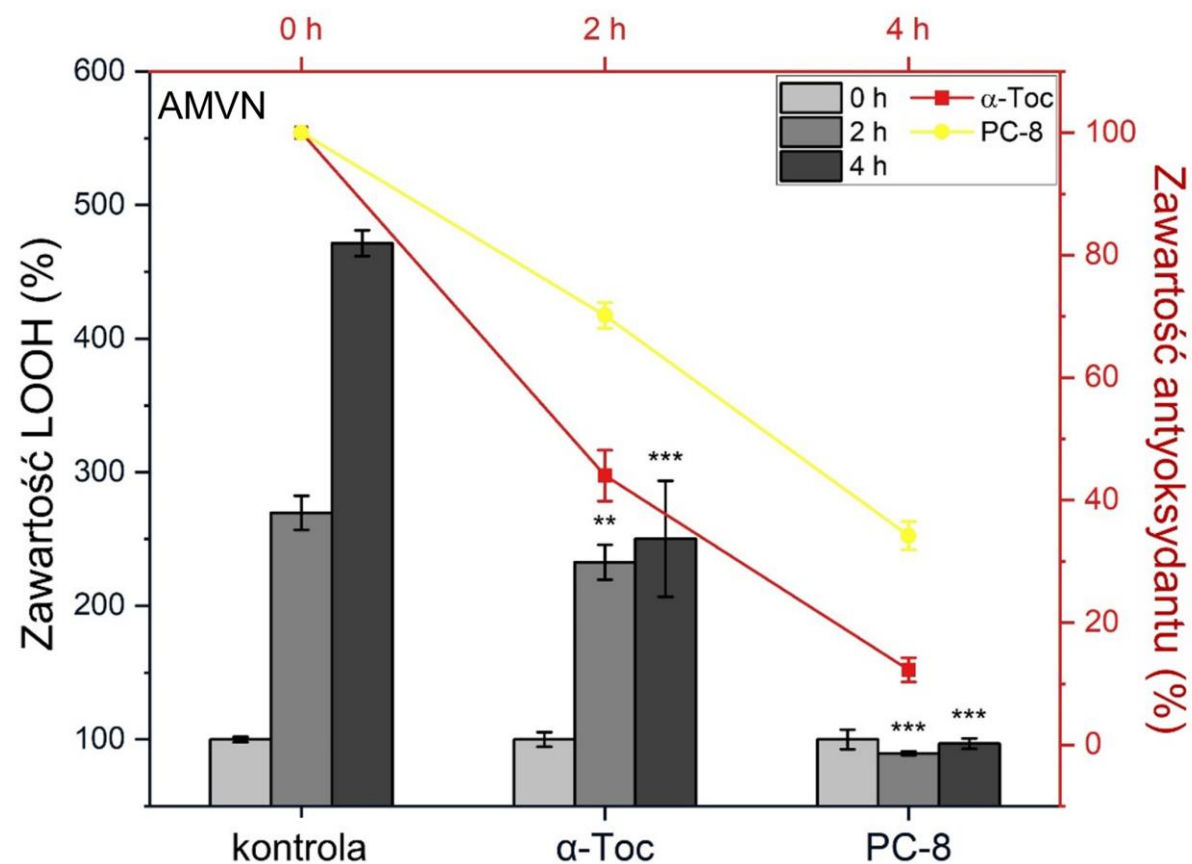


α-Toc – α-tokoferol

C18-ser – *N*-stearyloserotonina

C24-ser – *N*-lignoceryloserotonina

Aktywność antyoksydacyjna



α -Toc – α -tokoferol

PC-8 – plastochromanol-8

Aktywność antyoksydacyjna

Związek	Heksan		Acetonitryl	
	$t_{1/2}$ (s)	k (10^{-3} s^{-1})	$t_{1/2}$ (s)	k (10^{-3} s^{-1})
α-Toc	$11,2 \pm 0,7$	$61,6 \pm 4,1$	$22,0 \pm 1,0$	$31,6 \pm 1,4$
γ-Toc	$12,0 \pm 1,0$	$57,8 \pm 4,8$	$48,5 \pm 0,5$	$14,3 \pm 0,2$
δ-Toc	$21,2 \pm 0,3$	$32,6 \pm 0,4$	$274,5 \pm 9,5$	$2,5 \pm 0,1$
<i>n</i>-C22-ser	$27,5 \pm 3,0$	$25,2 \pm 2,7$	328 ± 114	$2,1 \pm 0,7$
<i>n</i>-C24-ser	$28,0 \pm 2,5$	$24,7 \pm 2,2$	183 ± 12	$3,7 \pm 0,2$
<i>n</i>-C26-ser	$29,3 \pm 1,7$	$23,7 \pm 1,4$	373 ± 25	$1,9 \pm 0,1$
Me-C22-ser	$38,0 \pm 2,0$	$18,2 \pm 0,9$	404 ± 12	$1,7 \pm 0,1$
Me-C24-ser	$43,5 \pm 1,5$	$15,9 \pm 0,6$	268 ± 16	$2,6 \pm 0,2$
<i>izo</i>-C21-ser	$25,1 \pm 0,4$	$27,6 \pm 0,4$	366 ± 10	$1,9 \pm 0,1$
<i>izo</i>-C25-ser	$17,0 \pm 0,6$	$40,8 \pm 1,4$	414 ± 30	$1,6 \pm 0,1$

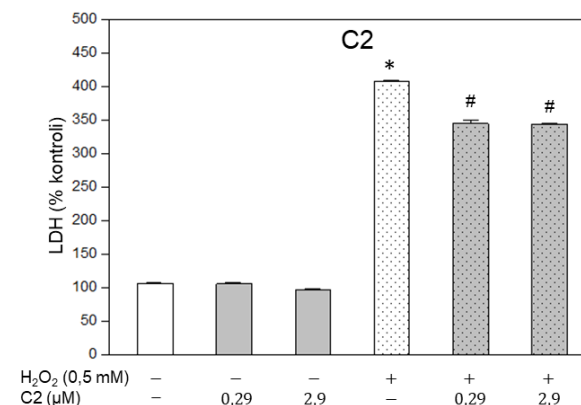
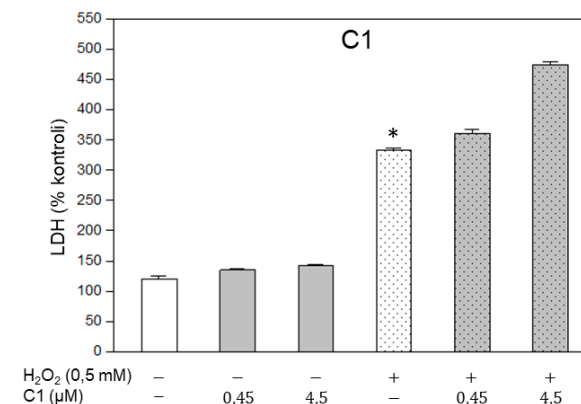
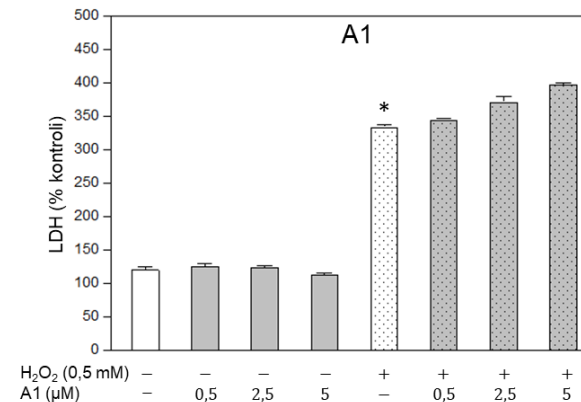
Działanie neuroprotekcyjne

- badania prowadzone we współpracy z Instytutem Farmakologii PAN im. Jerzego Maja (grupa Pani Prof. Agnieszki Basty-Kaim)
- linia komórkowa **SH-SY5Y** (ludzka linia neuroblastoma)
- czynnik uszkadzający: H_2O_2

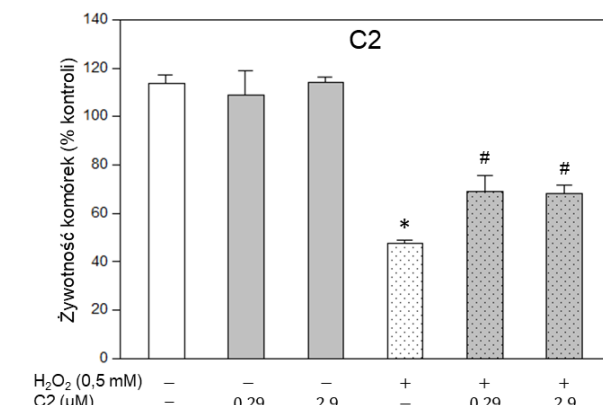
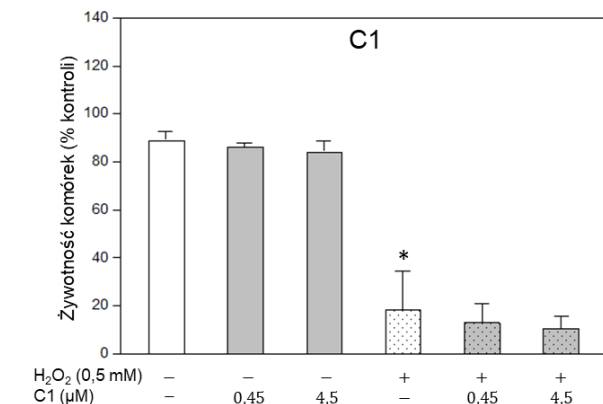
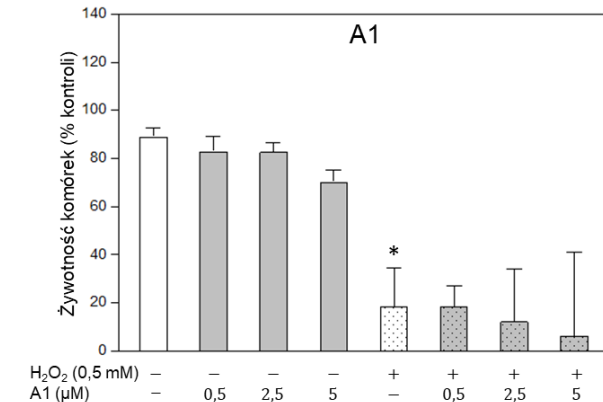
A1 – frakcja acylowych pochodnych serotoniny z oleju z nasion *Adansonia digitata*

C1 i C2 – frakcja acylowych pochodnych serotoniny z nasion *Citrus limon*

Test LDH



Test MTT

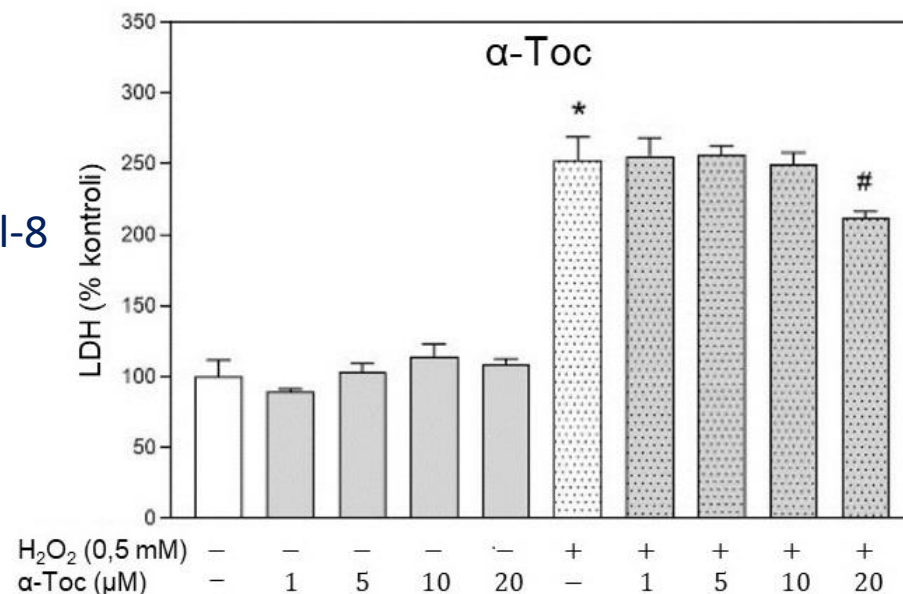


Działanie neuroprotekcyjne

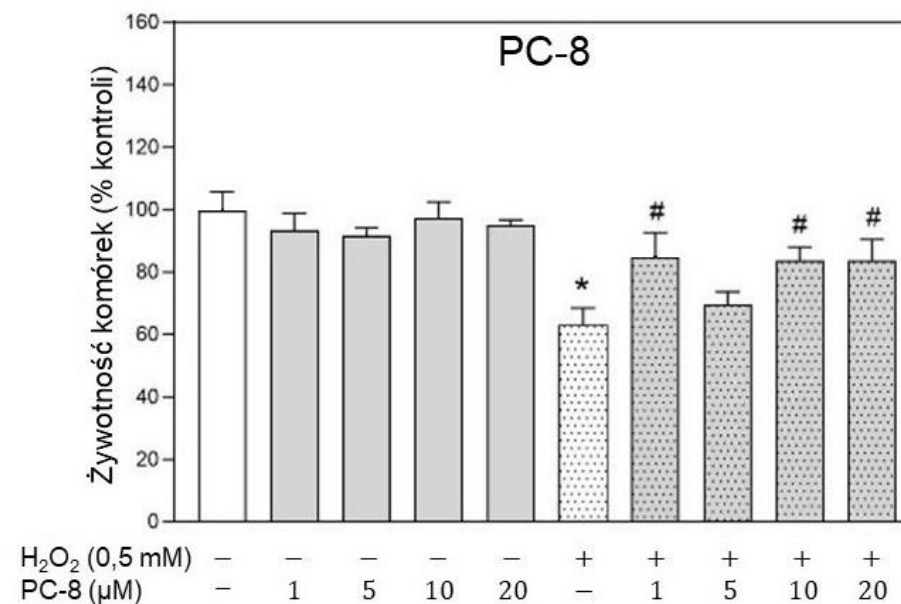
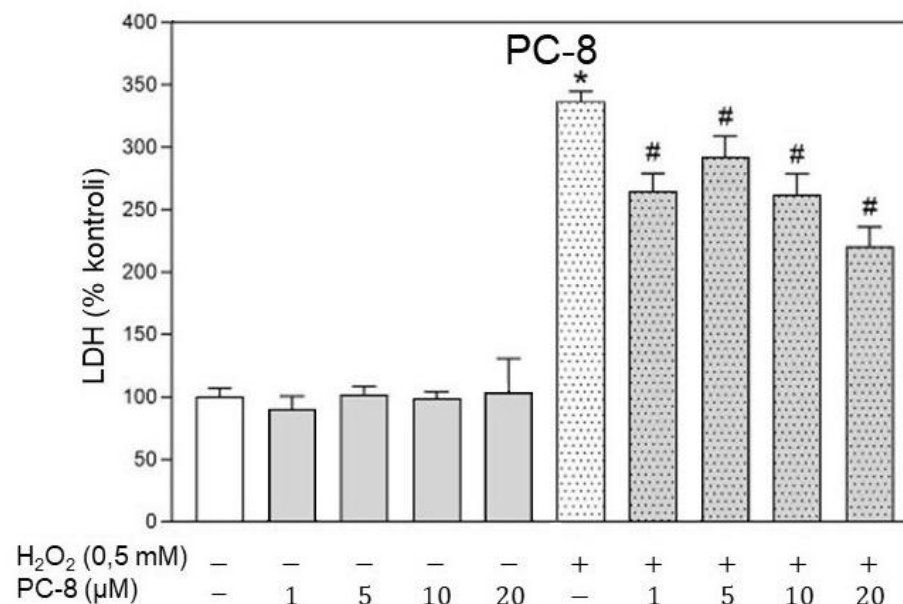
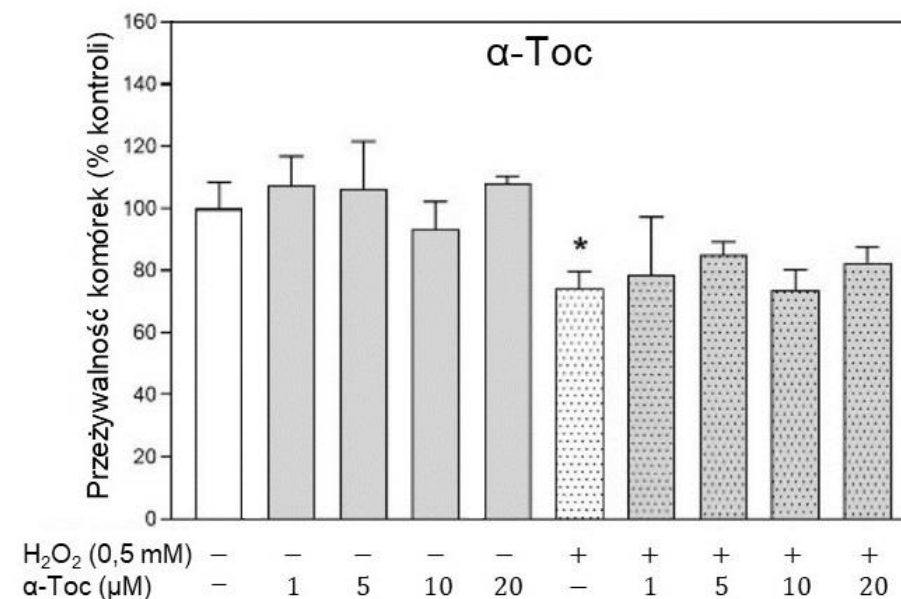
α-Toc – α-tokoferol

PC-8 – plastochromanol-8

Test LDH



Test MTT



Podsumowanie i wnioski

- Odkryte przez nas *N*-acylowe pochodne serotoniny nie były nigdy wcześniej opisane ani u roślin, ani u zwierząt. Oznacza to, że **zidentyfikowano zupełnie nową klasę związków**.
- W świetle wyników przeprowadzonych analiz oraz danych literaturowych, roślinne ***N*-acyloserotoniny mogą znaleźć zastosowanie nie tylko jako antyoksydanty, ale także związki o szerokim działaniu farmakologicznym**, co wymaga jednak dalszych, szczegółowych badań.
- W ujęciu poznawczym, odkrycie tych związków otwiera olbrzymie badania szlaków ich biosyntezy oraz funkcji u roślin.
- Analiza materiału roślinnego pod kątem dystrybucji tokochromanoli pozwoliła na wyłonienie gatunków o dużej zawartości rzadszych homologów tokochromanoli.
- Zrealizowane cele pozwoliły na rozszerzenie wiedzy o mniej rozpowszechnionych tokochromanolach i wskazały na obiecujące możliwości zastosowania ich jako silnych antyoksydantów oraz w farmakologii leczenia chorób neurodegeneracyjnych, co zwiększa tym samym ich potencjał aplikacyjny.

Podziękowania

Dziękuję serdecznie za uwagę!

Podziękowania dla:

- **dr hab. Renaty Szymańskiej, prof. AGH (WFiIS, AGH)**
- **prof. dr hab. Jerzego Kruka (WBBiB, UJ)**
- **prof. dr hab. Agnieszki Basty-Kaim (Instytut Farmakologii PAN)**
- **dr Moniki Leśkiewicz (Instytut Farmakologii PAN)**

Badania zostały wykonane w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój, nr projektu POWR.03.02.00-00-I004/16, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej.

Badania zostały częściowo sfinansowane z grantu Sonata UMO-2015/19/D/NZ9/00060 przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki, grantu Tango TANGO-IV-A/0017/2019-00 przyznanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, a także z grantu dziekańskiego Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH nr 15.11.220.717/6.