

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. Prof. Wacława Dąbrowskiego Państwowy Instytut Badawczy

mgr inż. Aleksandra Golonko

**Wpływ modyfikacji struktury na właściwości
fizykochemiczne i biologiczne
wybranych naturalnych bioaktywnych związków fenolowych
mających znaczenie w żywieniu człowieka**

The influence of structural modifications on the physicochemical and
biological properties of selected natural bioactive phenolic compounds
significant in human nutrition

Praca doktorska

Doctoral thesis

Promotor:

Prof. dr hab. Włodzimierz Lewandowski

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy

Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii
Politechnika Białostocka

Promotor pomocniczy:

Dr inż. Katarzyna Kycia
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy

Warszawa, 2024

Warszawa, dn.20.05.2025

Tytuł / stopień naukowy Promotora: Prof. dr hab
Imię i nazwisko Promotora: Włodzimierz Lewandowski
Dziedzina naukowa: Nauki ścisłe i przyrodnicze
Dyscyplina naukowa: Nauki chemiczne

Dyrektor Szkoły Doktorskiej
„AgroBioTech PhD”

Oświadczenie Promotora o przyjęciu rozprawy doktorskiej Pani

mgr inż. Aleksandry Gołonko
(tytuł/stopień / imię i nazwisko Autora rozprawy doktorskiej)

pt.: *Wpływ modyfikacji struktury na właściwości fizykochemiczne i biologiczne wybranych naturalnych bioaktywnych związków fenolowych mających znaczenie w żywieniu człowieka*

Jako Promotor przyjmuję niniejszą rozprawę doktorską, która spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2023, poz. 742 z późn. zm.) oraz może być skierowana do dalszych etapów związanych z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora w:

- dziedzinie nauk: nauki rolnicze
- dyscyplinie naukowej: technologia żywności i żywienia / rolnictwo i ogrodnictwo (2)


.....
(data i podpis Promotora)

Warszawa, dn. 20.05.2025

Tytuł / stopień naukowy Promotora: Dr inż.
Imię i nazwisko Promotora: Katarzyna Kycia
Dziedzina naukowa: Nauki rolnicze
Dyscyplina naukowa: Technologia żywności i żywienia

**Dyrektor Szkoły Doktorskiej
„AgroBioTech PhD”**

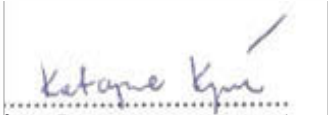
Oświadczenie Promotora pomocniczego o przyjęciu rozprawy doktorskiej Pani

mgr inż. Aleksandry Golonko
(tytuł/stopień / imię i nazwisko Autora rozprawy doktorskiej)

pt.: Wpływ modyfikacji struktury na właściwości fizykochemiczne i biologiczne wybranych naturalnych bioaktywnych związków fenolowych mających znaczenie w żywieniu człowieka

Jako Promotor przyjmuję niniejszą rozprawę doktorską, która spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2023, poz. 742 z późn. zm.) oraz może być skierowana do dalszych etapów związanych z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora w:

- dziedzinie nauk: nauki rolnicze
- dyscyplinie naukowej: technologia żywności i żywienia / ~~rolnictwo i ogrodnictwo~~ (2)


(data i podpis Promotora pomocniczego)

Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej

Świadom(a) odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska przygotowana przeze mnie nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni lub innej uprawnionej instytucji naukowej.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data.....19 05 2025.....

Podpis autora rozprawy doktorskiej

*Przede wszystkim wyrażam swoją wdzięczność mojemu promotorowi,
Profesorowi dr hab. Włodzimierzowi Lewandowskiemu, za nieocenioną motywację,
cierpliwość i cenne rady, które były nie tylko inspiracją, ale również fundamentem dla
mojego rozwoju naukowego. Dziękuję za zaufanie, którym mnie obdarzył oraz za wsparcie,
które umożliwiło mi ukończenie tej pracy.*

*Słowa podziękowania kieruję również do mojego promotora pomocniczego,
dr inż. Katarzynie Kyci, za okazaną pomoc i konsultacje, które znacząco
przyczyniły się do postępu moich badań.*

*Szczególne podziękowania składam Pani Profesor Renacie Świsłockiej za
nadzór metodyczny i merytoryczny oraz stałe wsparcie, który zapewniły
wysoki poziom naukowy niniejszej pracy.*

*Wyrażam także ogromną wdzięczność Profesorowi Waldemarowi Priebe za
wskazanie przyszłościowej ścieżki rozwoju naukowego oraz za ukazanie
kluczowej roli, jaką pełni technolog żywności w tematyce zdrowia i
profilaktyki. Pańskie rady umożliwiły mi głębsze zrozumienie związku między
żywieniem a zdrowiem, co stało się ważnym punktem mojej pracy.*

*Moim przyjaciołom – Marceli, Agacie,
Mateuszowi, Kasi, Adamowi P. – dziękuję za najlepszą motywację,
nieocenioną pomoc i pozytywne myśli, które towarzyszyły mi przez
cały czas trwania tego projektu.*

*Na koniec, składam serdeczne
podziękowania dr Adamowi Olichwierowi za pomoc w pracy
laboratoryjnej oraz nadzór merytoryczny w zakresie metod
biologii molekularnej, które miały kluczowe znaczenie dla
jakości przeprowadzonych badań.*

*Dziękuję wszystkim za wsparcie, bez którego ta
praca nie mogłaby zostać ukończona.*

Streszczenie

Wpływ modyfikacji struktury na właściwości fizykochemiczne i biologiczne wybranych naturalnych bioaktywnych związków fenolowych mających znaczenie w żywieniu człowieka

Niniejsza praca doktorska bada modyfikacje strukturalne wybranych naturalnych związków fenolowych, w szczególności flawonoidów, w celu zwiększenia ich funkcjonalności w technologii żywności oraz terapii onkologicznej. Praca koncentruje się na takich związkach jak resweratrol, kwercetyna, kaempferol i chryzyna, analizując ich potencjał w poprawie efektów terapeutycznych leków przeciwnowotworowych poprzez aktywność redoks. Badania pokazują, w jaki sposób można optymalizować te związki do zastosowania w żywności funkcjonalnej, poprawiając ich biodostępność i właściwości antyoksydacyjne, co wspiera ich włączenie do diet o działaniu przeciwnowotworowym. Wykorzystano metody obliczeń kwantowo-mechanicznych, aby określić energie orbitali molekularnych (HOMO-LUMO) oraz przerwy energetyczne (eGAP), co wykazało wyższy potencjał redoks związków takich jak kwercetyna i kaempferol. Flawonoidy te, charakteryzujące się niskimi wartościami eGAP, wykazały istotną aktywność antyoksydacyjną, co wspiera ich rolę w redukcji stresu oksydacyjnego i wzmacnianiu skuteczności chemioterapii poprzez indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych. Dodatkowo, badania obejmowały analizę kompleksów flawonoidów z metalami, takimi jak cynk i miedź, z zastosowaniem metod spektrofotometrycznych (UV-Vis, FT-IR) oraz testów cytotoxyczności na liniach komórkowych nowotworowych (MCF-7 i MDA-MB-231). Kompleksy te wykazały zwiększoną stabilność i bioaktywność, co znacząco zwiększa ich potencjał terapeutyczny w żywności funkcjonalnej wspomagającej leczenie nowotworów. W badaniach zwrócono również uwagę na ograniczenia biodostępności i przeprowadzono analizy nad strategiami jej zwiększenia poprzez modyfikacje strukturalne. Wyniki sugerują, że żywność funkcjonalna wzbogacona w zmodyfikowane flawonoidy może być wartościowym uzupełnieniem terapii przeciwnowotworowych, zmniejszając skutki uboczne leków i poprawiając efekty terapeutyczne.

Słowa kluczowe: *żywność funkcjonalna, dietoterapia, biodostępność, metalokompleksy, ładunek elektronowy*

Abstract

The influence of structural modifications on the physicochemical and biological properties of selected natural bioactive phenolic compounds significant in human nutrition

This dissertation investigates the structural modifications of selected natural phenolic compounds, particularly flavonoids, to enhance their functionality in food technology and cancer therapy. The research focuses on compounds like resveratrol, quercetin, kaempferol, and chrysin, examining their potential to improve the therapeutic effects of anticancer drugs through redox activity. The study explores how these compounds can be optimized for use in functional foods, improving their bioavailability and antioxidant properties, thus supporting their integration into cancer-preventive diets. Key methodologies include quantum-mechanical calculations to determine molecular orbital energies (HOMO-LUMO) and energy gaps (eGAP), which highlight the enhanced redox potential of compounds like quercetin and kaempferol. These flavonoids, with lower eGAP values, demonstrated significant antioxidant activity, which supports their role in reducing oxidative stress and enhancing the efficacy of chemotherapy by promoting apoptosis in cancer cells. In addition, the study investigates flavonoid-metal complexes, particularly with zinc and copper, through spectrophotometric analysis (UV-Vis, FT-IR) and cytotoxicity assays on cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231). These complexes demonstrated increased stability and bioactivity, significantly improving their therapeutic potential in functional foods aimed at supporting cancer treatment. The research also emphasizes the challenge of bioavailability and investigates strategies such as structural modification to enhance the absorption and stability of these compounds. The findings suggest that functional foods enriched with modified flavonoids could act as valuable supplements, complementing traditional cancer therapies by reducing drug side effects and improving patient outcomes.

Keywords: *functional foods, dietotherapy, bioavailability, metal complexes, electron charge*

SPIS TREŚCI

DOROBK NAUKOWY	4
1. WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO.....	5
1.1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską wchodzących w skład rozprawy.....	5
1.2. Wykaz pozostałych publikacji naukowych – niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej.	6
1.2.1. Publikacje JCR:	6
1.2.2. Publikacje poza JCR:.....	7
1.3. Wykaz doniesień konferencyjnych innych zjazdów naukowych (referaty, postery) z podziałem na krajowe i międzynarodowe.....	8
1.3.1. Referaty krajowe.....	8
1.3.2. Referaty międzynarodowe	8
1.3.3. Postery krajowe	9
1.3.4. Postery międzynarodowe.....	10
1.4. Wykaz innych aktywności naukowych	11
1.4.1. Granty, kierowane przez Doktorantkę	11
1.4.2. Granty realizowane jako współwykonawca	11
1.4.3. Staże naukowe.....	11
1.4.4. Nagrody naukowe	11
WPROWADZENIE	12
3. AKTUALNA WIEDZA- PRZEGLĄD LITERATURY.....	14
3.1. Związki fenolowe w diecie człowieka	17
3.1.1. Działanie prozdrowotne.....	17
3.1.2. Flawonoidy w prewencji chorób nowotworowych	18
3.1.3. Metabolizm flawonoidów i ograniczenia w ich biodostępności.....	19
3.2. Znaczenie flawonoidów w technologii żywności, jako składnik żywności funkcjonalnej	22
3.3. Modyfikacje chemiczne flawonoidów	25
3.4. Flawonoidy i ich modyfikacje w suplementacji i specjalistycznym żywieniu onkologicznym.....	28
4. CEL I HIPOTEZY BADAWCZE	31
4.1. Cel badań.....	31
4.2. Hipotezy badawcze.....	33
4.3. Zadania badawcze.....	34
5. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	36
5.1. Deskryptory fizykochemiczne w ocenie właściwości ligandów	36
5.1.1. Deskryptory globalne	36
5.1.2. Energia dysocjacji wiązania	39
5.1.3. Deskryptor reaktywności lokalnej- funkcja Fukui	41
5.2. Deskryptory biodostępności flawonoidów i ich znaczenie	42
5.3. Właściwości antyoksydacyjne i prooksydacyjne	44
5.3.1. Metoda DPPH (2,2-Difenylo-1-pikrylohydrazyl)	45
5.3.2. Metoda ABTS (2,2'-Azylo-bis(3-etylo-benzo-tiazolino-6-sulfonian))	46
5.3.3. Metoda CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity).....	46
5.3.4. Metoda HORAC (Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity).....	46

5.3.5. Metoda redukcji tlenu azotu (NO) przy użyciu odczynnika Griessa.....	46
5.3.6. Prooksydacyjne utlenianie Troloxu.....	47
5.4. Właściwości przeciwnowotworowe i chemoprewencyjne.....	48
6. METODY BADAWCZE.....	50
6.1. Chemia teoretyczna (obliczeniowa).....	50
6.1.1. Przygotowanie struktur wejściowych.....	50
6.1.2. Optymalizacja geometrii.....	50
6.1.3. Obliczenia rozkładu ładunku elektronowego (NPA).....	51
6.1.4. Indeksy aromatyczności.....	51
6.1.5. Graniczna gęstość rodnikowa.....	51
6.1.6. Potencjał elektrostatyczny.....	52
6.1.7. Energia dysocjacji wiązania (BDE).....	52
6.1.8. Funkcja Fukui.....	52
6.2.1. TPSA (Topologiczna Powierzchnia Polarna).....	53
6.2.2. LogP (Współczynnik podziału oktanol-woda).....	53
6.2.3. Reguła Lipińskiego.....	53
6.2.4. Stopień absorpcji jelitowej.....	54
6.2.5. Metoda "Boiled Egg".....	54
6.2.6. Model rozpuszczalności ESOL.....	54
6.2.7. Liczba wiązań obrotowych (nrotb).....	55
6.3. Metody badania właściwości antyoksydacyjnych.....	56
6.3.1. Metoda DPPH.....	56
6.3.2. Metoda ABTS.....	56
6.3.3. Metoda CUPRAC.....	56
6.3.4. Metoda HORAC.....	57
6.3.5. Metoda redukcji tlenu azotu.....	57
6.3.6. Prooksydacyjne utlenianie Troloxu.....	57
6.4. Metody badania właściwości cytotoksycznych.....	58
6.4.1. Przygotowanie próbek.....	58
6.4.2. Warunki hodowli komórek.....	58
6.4.3. Pomiar cytotoksyczności.....	58
6.4.4. Analiza danych.....	59
6.4.5. Badanie morfologii komórek.....	59
6.4.6. Ocena wpływu na cytotoksyczność leku.....	59
6.4.7. Mikroskopia fluorescencyjna.....	59
6.5. Tworzenie kompleksów z metalami i ich analiza spektrofotometryczna.....	60
6.5.1. Przygotowanie ligandów i rozpuszczalników.....	60
6.5.2. Synteza związków kompleksowych.....	60
6.5.3. Przygotowanie próbek do badań biologicznych.....	60
6.5.4. Badanie struktury metodami spektrofotometrycznymi.....	61
6.5.5. Badania stechiometrii związków kompleksowych w roztworze.....	62
6.6. Genotoksyczność.....	63
6.6.1. Przygotowanie struktur do dokowania molekularnego.....	63
6.6.2. Test z wykorzystaniem modyfikowanego szczepu bakterii.....	63
MATERIAŁY OPUBLIKOWANE.....	65
Another look at phenolic compounds in cancer therapy: the effect of polyphenols on ubiquitin-proteasome system.....	66
Curcumin as tyrosine kinase inhibitor in cancer treatment.....	70

<i>Why Do Dietary Flavonoids Have a Promising Effect as Enhancers of Anthracyclines? Hydroxyl Substituents, Bioavailability and Biological Activity</i>	74
<i>Dietary factors and their influence on immunotherapy strategies in oncology: a comprehensive review</i>	78
<i>Apigenin's Modulation of Doxorubicin Efficacy in Breast Cancer</i>	82
<i>Biomaterials in Cancer Therapy: Investigating the Interaction between Kaempferol and Zinc Ions through Computational, Spectroscopic and Biological Analyses</i>	86
MATERIAŁY NIEOPUBLIKOWANE	90
7. WYNIKI	91
7.1. <i>Obliczenia kwantowo-mechaniczne</i>	91
7.1.1. Energia HOMO-LUMO i przerwa energetyczna (eGAP).....	91
7.1.2. Indeksy elektrofilowości i elektrodonorowości	91
7.1.3. Funkcja Fukui	93
7.1.4. Graniczna gęstość rodnikowa.....	94
7.1.5. Bond Dissociation Energy (BDE).....	95
7.1.6. Indeks aromatyczności.....	96
7.1.7. Analiza wartości Mullikena i NPA (Natural Population Analysis).....	99
7.2. <i>Analiza biodostępności</i>	101
7.3. <i>Właściwości antyoksydacyjne</i>	108
7.3.1. Metoda DPPH.....	108
7.3.2. Metoda ABTS	110
7.3.3. Metoda CUPRAC.....	112
7.3.4. Metoda HORAC	113
7.3.5. Redukcja rodnika tlenu azotu	115
7.3.6. Prooksydacyjne utlenianie Troloxu.....	116
7.4. <i>Właściwości cytotoksyczne</i>	117
7.4.1. Właściwości cytotoksyczne ligandów.....	117
7.4.2. Cytotoksyczność ligandu i jego metalokompleksu	120
7.5. <i>Genotoksyczność i zdolność wiązania z DNA</i>	124
7.5.1. Genotoksyczność in vivo.....	124
7.5.2. Modelowanie molekularne	126
7.6. <i>Struktura związku a ich aktywność biologiczna</i>	127
8. PODSUMOWANIE.....	130
8.1. <i>Dyskusja wyników</i>	130
8.2. <i>Weryfikacja hipotez badawczych</i>	133
9. WNIOSKI	136
BIBLIOGRAFIA	137

I

Dorobek Naukowy

Tabela 1. Łączne dane bibliometryczne doktoranta na dzień złożenia rozprawy doktorskiej

Liczba publikacji z listy JCR	17	(w tym 6 artykułów pierwszoautorskich)
Liczba publikacji spoza listy JCR	10	
Sumaryczna liczba punktów IF	64,07	zgodnie z punktacją IF na 2023r.
Sumaryczna liczba punktów MNiSW	1980	
Sumaryczna liczba cytowań	518	na dzień 29.09.2024 wg. bazy Google Scholar
Indeks Hirsha	11	na dzień 29.09.2024 wg. bazy Google Scholar

Niniejsza praca doktorska została zrealizowana w formie hybrydowej, łącząc opublikowane artykuły naukowe (Tabela 1) z jeszcze nieopublikowanymi wynikami badań. Część publikacji, tworząca spójny tematycznie cykl, została włączona do zasadniczej struktury rozprawy, a jej uzupełnienie stanowią nieopublikowane rezultaty, które razem z opublikowanymi artykułami w pełni realizują założenia i cele wyznaczone w temacie pracy.

1. Wykaz dorobku naukowego

1.1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską wchodzących w skład rozprawy

1. **Golonko, A.**, Pienkowski, T., Świsłocka, R., Łażny, R., Roszko, M., & Lewandowski, W. (2019). Another look at phenolic compounds in cancer therapy: the effect of polyphenols on ubiquitin-proteasome system. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 167, 291–311. Elsevier Masson. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.01.044; (IF: 6, 140 pkt MNiSW)
2. **Golonko, A.**, Lewandowska, H., Świsłocka, R., Jasińska, U.T., Priebe, W., & Lewandowski, W. (2019). Curcumin as tyrosine kinase inhibitor in cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 181, 111512. Elsevier Masson. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.07.015; (IF: 6, 140 pkt MNiSW)
3. **Golonko, A.**, Olichwier, A.J., Świsłocka, R., Szczerciński, Ł., & Lewandowski, W. (2022). Why do dietary flavonoids have a promising effect as enhancers of anthracyclines? Hydroxyl substituents, bioavailability and biological activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 391. MDPI. doi.org/10.3390/ijms24010391; (IF: 4.9, 140 pkt MNiSW)
4. **Golonko, A.**, Pienkowski, T., Świsłocka, R., Orzechowska, S., Marszałek, K., Szczerciński, Ł., Świergiel, A.H., & Lewandowski, W. (2024). Dietary factors and their influence on immunotherapy strategies in oncology: A comprehensive review. *Cell Death & Disease*, 15(4), 254. Nature Publishing Group UK London. doi: 10.1038/s41419-024-06641-6. (IF: 8.1, 140 pkt MNiSW)
5. **Golonko, A.**, Olichwier, A. J., Szklaruk, A., Paszko, A., Świsłocka, R., Szczerciński, Ł., & Lewandowski, W. (2024). Apigenin's modulation of doxorubicin efficacy in breast cancer. *Molecules*, **29**(11), 2603. doi:10.3390/molecules29112603 (IF: 4,2, 140 pkt MNiSW)
6. **Golonko, A.**, Olichwier, A. J., Paszko, A., Świsłocka, R., Szczerciński, Ł., & Lewandowski, W. (2024). Biomaterials in cancer therapy: Investigating the interaction between kaempferol and zinc ions through computational, spectroscopic and biological analyses. *Materials*, **17**(11), 2526. doi:10.3390/ma17112526 (IF: 3,1, 140 pkt MNiSW)

1.2. Wykaz pozostałych publikacji naukowych – niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1.2.1. Publikacje JCR

1. **Golonko, A., Świsłocka, R., & Lewandowski, W.** (2016). Quercetin-metal complexes as potential drugs with anticancer activity. The structure, activity and bioavailability. *Przemysł Chemiczny*, 95(9), 1774–1780. Wydawnictwo Książek i Czasopism SIGMA, Warszawa. doi: 10.15199/62.2016.9.24; (IF: 0.50, 100 pkt MNiSW)
2. Grzybek, M., **Golonko, A., Górską, A., Szczepaniak, K., Strachecka, A., Lass, A., & Lisowski, P.** (2018). The CRISPR/Cas9 system sheds new lights on the biology of protozoan parasites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 4629–4640. Springer Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/s00253-018-8927-3; (IF: 3.9, 100 pkt MNiSW)
3. Matejczyk, M., Świsłocka, R., **Golonko, A., Lewandowski, W., & Hawrylik, E.** (2018). Cytotoxic, genotoxic and antimicrobial activity of caffeic and rosmarinic acids and their lithium, sodium and potassium salts as potential anticancer compounds. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 14–21. Elsevier; DOI: 10.1016/j.advms.2017.07.003; (IF: 2.5, 100 pkt MNiSW)
4. Grzybek, M., **Golonko, A., Walczak, M., & Lisowski, P.** (2017). Epigenetics of cell fate reprogramming and its implications for neurological disorders modelling. *Neurobiology of Disease*, 99, 84–120. Academic Press. doi.org/10.1016/j.nbd.2016.11.007; (IF: 5.1, 100 pkt MNiSW)
5. **Golonko, A., Pollak, A., Rydzanicz, M., Ploski, R., & Lisowski, P.** (2017). Human induced pluripotent stem cell (HIPSCS) based Huntington's disease (HD) neurons and their genetic correction using personalized RNA-guided designer nucleases (CAS9) mediated genome editing. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 77(Suppl. 1). (IF: 1.4, 100 pkt MNiSW)
6. Lewandowski, W., Lewandowska, H., **Golonko, A., Świdorski, G., Świsłocka, R., & Kalinowska, M.** (2020). Correlations between molecular structure and biological activity in "logical series" of dietary chromone derivatives. *PLoS One*, 15(8), e0229477. Public Library of Science San Francisco, CA USA. /doi.org/10.1371/journal.pone.0229477; (IF: 2.9, 100 pkt MNiSW)
7. Godlewska-Żyłkiewicz, B., Świsłocka, R., Kalinowska, M., **Golonko, A., Świdorski, G., Arciszewska, Ż., Nalewajko-Sieliwoniuk, E., Naumowicz, M., & Lewandowski, W.** (2020). Biologically active compounds of plants: Structure-related antioxidant, microbiological and cytotoxic activity of selected carboxylic acids. *Materials*, 13(19), 4454. MDPI. doi.org/10.3390/ma13194454; (IF: 3.57, 100 pkt MNiSW)
8. **Choińska, R., Zawadzka, M., Golonko, A., Świsłocka, R., & Lewandowski, W.** (2020). Kwas cykoriowy i jego właściwości lecznicze. *Przemysł Chemiczny*, 99(8), 1210–1214. Wydawnictwo SIGMA-NOT. doi.org/10.15199/62.2020.8.19 (IF: 0.50, 100 pkt MNiSW)
9. Świdorski, G., Łażny, R., Sienkiewicz, M., Kalinowska, M., Świsłocka, R., Acar, A.O., **Golonko, A., Matejczyk, M., & Lewandowski, W.** (2021). Synthesis, spectroscopic, and theoretical study of copper and cobalt complexes with dacarbazine. *Materials*, 14(12), 3274. MDPI. DOI: 10.3390/ma14123274; (IF: 3.1, 140 pkt MNiSW)
10. Kowalczyk, M., **Golonko, A., Świsłocka, R., Kalinowska, M., Parcheta, M., Świergiel, A., & Lewandowski, W.** (2021). Drug design strategies for the treatment of viral disease. Plant phenolic compounds and their derivatives. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 709104. Frontiers. DOI: 10.3389/fphar.2021.709104; (IF: 4.4, 100 pkt MNiSW)
11. Szczerbiński, Ł., **Golonko, A., Taylor, M., Puchta, U., Konopka, P., Paszko, A., Citko, A., Szczerbiński, K., Górską, M., & Zabielski, P.** (2021). Metabolomic profile of skeletal muscle and its change under a mixed-mode exercise intervention in progressively dysglycemic subjects. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 778442. Frontiers Media SA. DOI: 10.3389/fendo.2021.778442; (IF: 3.9, 100 pkt MNiSW)

1.2.2. Publikacje poza JCR

1. **Golonko**, A., Kalinowska, M., Świsłocka, R., Świdorski, G., & Lewandowski, W. (2015). Zastosowanie związków fenolowych i ich pochodnych w przemyśle i medycynie. *Budownictwo i Inżynieria Środowiska*, 6(4), 161–179. Politechnika Białostocka. Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej. (Brak IF, 5 pkt MNiSW)
2. Lewandowski, W., Świsłocka, R., **Golonko**, A., Świdorski, G., & Kalinowska, M. (2017). Physicochemical investigation of caffeic acid and caffeinates with chosen metals (Na, Mg, Al, Fe, Ru, Os). *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Chemical and Molecular Engineering*, 4(5). (Brak IF, brak pkt MNiSW)
3. Matejczyk, M., **Golonko**, A., & Chilton, E. (2017). Aloe vera–wybrane właściwości biologiczne. *Budownictwo i Inżynieria Środowiska*, 8(4). (Brak IF, 5 pkt MNiSW)
4. **Golonko**, A., & Matejczyk, M. (2018). Dwa oblicza selenu. Wybrane aspekty aktywności biologicznej selenu. *Budownictwo i Inżynieria Środowiska*, 9(2). (Brak IF, 5 pkt MNiSW)
5. **Golonko**, A., Świsłocka, R., Kalinowska, M., & Lewandowski, W. (2019). Kwas taninowy-składnik prozdrowotny czy antyodżywczy? *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*, 74(3-4). (Brak IF, brak pkt MNiSW)
6. **Golonko**, A., Świsłocka, R., Kalinowska, M., & Lewandowski, W. (2019). Tannic acid-a pro-health or anti-nutritional compound? *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*, 74(3/4), 89–101. Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego. (Brak IF, brak pkt MNiSW)
7. Warpechowski, J., Olichwier, A., **Golonko**, A., Warpechowski, M., & Milewski, R. (2023). Literature review—Transthoracic echocardiography, computed tomography angiography, and their value in clinical decision making and outcome predictions in patients with COVID-19 associated cardiovascular complications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(12), 6123. MDPI. DOI: 10.3390/ijerph20126123; (IF: brak, 20 pkt MNiSW)
8. **Golonko**, A., Swislocka, R., & Lewandowski, W. (2023). Kompleksowanie kwercetyny miedzią(II) a zdolność do interakcji z DNA. W Z. Hubicki (Red.), *Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*; Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. ISBN 978-83-227-9700-6 (IF: brak, 20 pkt MNiSW)
9. **Golonko**, A. Z., Świsłocka, R., & Lewandowski, W. (2020). Związki kompleksowe chryzyny z miedzią. Analiza fizykochemiczna i możliwości aplikacyjne. *Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie*. Wydawnictwo UMCS. ISBN 978-83-227-9370-1 (IF: brak, 20 pkt MNiSW)
10. **Golonko**, A., Szklaruk, A., Świsłocka, R., & Lewandowski, W. (2024). Application of flavonoid potential for metal complexing in food technology and nutrition. Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej. (ISBN 978-83-227-9805-8) (IF: brak, 20 pkt MNiSW)

1.3. Wykaz doniesień konferencyjnych innych zjazdów naukowych (referaty, postery) z podziałem na krajowe i międzynarodowe

1.3.1. Referaty krajowe

- **Golonko, A.**, Szklaruk, A., Paszko, A., Olichwier, A., Świsłocka, R., Szczerbinski, Ł., & Lewandowski, W. (2017, wrzesień 11–14). *Huntington's Disease HTT gene editing, clonal isolation and differentiation into neurons of interest of patient-specific induced pluripotent stem cells (hiPSCs) using high fidelity Cas9 system*. Prezentacja na Międzynarodowym Kongresie Eurobiotech, Kraków, Polska. Organizatorzy: Komitet Biotechnologii PAN, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Polska Federacja Biotechnologii.
- **Golonko, A.**, Świsłocka, R., Paszko, A., & Lewandowski, W. (2019, czerwiec 27–29). *Bioaktywne składniki zawarte w lebidocze pospolitej (Origanum vulgare). Tworzenie kompleksów z metalami jako metoda wzmocnienia aktywności przeciwdrobnoustrojowej*. Prezentacja na VI Konferencji „Związki biologicznie czynne: aktywność, struktura, synteza”, Białystok, Polska.

1.3.2. Referaty międzynarodowe

- **Golonko, A.**, Paszko, A., Szczerbinski, Ł., Świsłocka, R., & Lewandowski, W. (2021). *Cytotoxic effects of combination of resveratrol and doxorubicin: Effects on mitochondrial respiration*. Prezentacja na Polyphenols Applications 2021, organizowana przez International Society of Antioxidants.
- **Golonko, A.**, Paszko, A., Świsłocka, R., Lewandowski, W., Citko, A., Szczerbinski, Ł., & Krętowski, A. (2023, sierpień 24). *Modulation of Mitochondrial Function and Antioxidant Response in Breast Cancer Treatment: A Study of the Combinational Therapy of Doxorubicin and Kaempferol*. Prezentacja na konferencji w Kopenhadze, Dania.
- **Golonko, A.**, Pollak, A., Rydzanicz, M., Płoski, R., & Lisowski, P. (2017). *Human induced pluripotent stem cell (hiPSCs) based Huntington's Disease (HD) neurons and their genetic correction using personalized RNA-guided designer nucleases (Cas9) mediated genome editing*. Prezentacja na The 13th International Congress of the Polish Neuroscience Society, Warszawa, Polska.

1.3.3. Postery krajowe

- **Golonko, A.**, Olichwier, A., Szklaruk, A., Paszko, A., Świsłocka, R., Szczerbinski, Ł., & Lewandowski, W. (2022). *The Role of Apigenin in Doxorubicin-Dependent Anti-Cancer Action*. Poster na Eurobiotech 2022, Kraków, Polska.
- **Golonko, A.**, & Lisowski, P. (2016). *Znaczenie metylacji DNA w patogenezie otępienia z cechami neurodegeneracji*. Poster na Ogólnopolskiej Konferencji Bioinformatycznej „Liczby, Komputery, Życie”, Kraków, Polska.
- **Golonko, A.**, Lisowski, P., & Lewandowski, W. (2016). *Terapia genowa choroby Huntingtona - inaktywacja neurotoksycznej ekspansji powtórzeń CAG za pomocą spersonalizowanego, wysoce specyficznego systemu edycji genów*. Poster na Ogólnopolskiej Konferencji Neurobiologicznej „Neuron”, Lublin, Polska.
- **Golonko, A.**, Świsłocka, R., & Lewandowski, W. (2016). *Mechanizmy przeciwnowotworowego działania kurkuminy i jej kompleksów z metalami przejściowymi*. Poster na konferencji „Postępy w Badaniach Biomedycznych”, Warszawa, Polska.
- **Golonko, A.**, Świsłocka, R., & Lewandowski, W. (2016). *Analiza hydroksypochodnych kwasu cynamonowego i ich soli z wybranymi litowcami. Potencjalne zastosowanie badanych związków w biotechnologii i inżynierii środowiska*. Poster na konferencji „Inżynieria Środowiska Młodym Okiem”, Białystok, Polska

1.3.4. Postery międzynarodowe

- Świsłocka, R., **Golonko, A.**, Świdorski, G., Kalinowska, M., & Lewandowski, W. (2016). *Spectroscopic and crystallographic study of selected phenolic compounds*. Poster na 3rd European Crystallography School 2016, Chorwacja.
- Lewandowski, W., Świsłocka, R., **Golonko, A.**, Świdorski, G., & Kalinowska, M. (2017). *Investigation of Caffeic Acid and Caffeinates with Chosen Metals (Na, Mg, Al, Fe, Ru, Os)*. Prezentacja na 19th International Conference on Advances in Chemistry and Applied Chemistry, Singapur.
- **Golonko, A.**, Swislocka, R., Paszko, A., Olichwier, A., Szczerbinski, Ł., & Lewandowski, W. (2022). *Synthesis, Structure and Molecular Mechanisms Responsible for the Cytotoxic Activity of Natural Phenolic Compounds and Their Novel Complexes in Cancer Cells*. Poster na Gordon Research Conference on Natural Products and Bioactive Compounds, Andover, USA.
- Lewandowski, W., **Golonko, A.**, Świsłocka, R., Paszko, A., Olichwier, A.J., & Szczerbinski, Ł. (2022). *Biological properties of kaempferol conditioned by the presence of transition metal ions: Structure-activity relationship*. Prezentacja na Gordon Research Conference on Natural Products and Bioactive Compounds, Andover, USA.
- Swislocka, R., **Golonko, A.**, Baginska, S., Matejczyk, M., & Lewandowski, W. (2022). *Can the components of essential oils – monoterpenes be modern, functional and antioxidants as well as save food preservatives?*. Prezentacja na Gordon Research Conference on Natural Products and Bioactive Compounds, Andover, USA.

1.4. Wykaz innych aktywności naukowych

1.4.1. Granty, kierowane przez Doktorantkę

Diamentowy Grant, edycja 2019, „Bioaktywne flawonoidy pochodzenia roślinnego i ich metalokompleksy w skojarzeniu z antybiotykami antracyklinowymi w terapii chorób nowotworowych”, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, 2019-2023, kierownik grantu: Aleksandra Golonko, 0233/DIA/2019/48

1.4.2. Granty realizowane jako współwykonawca

Opus, Badania wpływu wybranych metali na zmianę właściwości antyoksydacyjnych związków naturalnych występujących w produktach żywnościowych pochodzenia roślinnego, kierownik: prof. dr hab. Włodzimierz Lewandowski, 2015/17/B/NZ9/03581, finansowane przez Narodowe Centrum Nauki, wykonawca 2016-2019

Opus, Badania zależności między strukturą molekularną a aktywnością biologiczną związków pochodzenia naturalnego o potencjalnym działaniu konserwującym i ich kompleksów z metalami, kierownik: prof. dr hab. Włodzimierz Lewandowski, 2018/29/B/NZ9/01997, finansowane przez Narodowe Centrum Nauki, wykonawca 2019-2021

Opus, Badania nad poprawą selektywności i aktywności wybranych leków i naturalnych związków o właściwościach przeciwnowotworowych pod wpływem kompleksowania metalami, kierownik: prof. dr hab. Włodzimierz Lewandowski, 2014/13/B/NZ7/02352, finansowane przez Narodowe Centrum Nauki, wykonawca 2017-2018

1.4.3. Staże naukowe

Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, lipiec-sierpień 2016.

Zakład Neurobiologii Naprawczej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk, sierpień 2017.

Zakład Genetyki Medycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, maj-lipiec 2018.

1.4.4. Nagrody naukowe

2018 – stypendium za wybitne osiągnięcia w nauce, przyznane przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego

2017- stypendium za wybitne osiągnięcia w nauce, przyznane przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego

2020- Laureatka Nagrody Inteligentnego Rozwoju w kategorii Naukowiec Przyszłość

II

Wprowadzenie

Związki fenolowe, znane również jako hydroksybenzeny, stanowią niezwykle zróżnicowaną i bogatą grupę związków organicznych, które charakteryzują się obecnością grupy hydroksylowej (-OH) przyłączonej do pierścienia aromatycznego. Ich obecność w strukturach chemicznych prowadzi do unikalnych właściwości fizykochemicznych, które sprawiają, że związki te są interesujące zarówno z naukowego, jak i przemysłowego punktu widzenia. Mogą one pełnić funkcję antyoksydantów, zapobiegając uszkodzeniom komórek wywołanym przez reaktywne formy tlenu (ROS). Ta zdolność do neutralizacji wolnych rodników przyczynia się do ich ochronnego działania w organizmach roślinnych i zwierzęcych, w tym człowieka.

Związki fenolowe występują powszechnie w naturze, w szczególności w roślinach, gdzie pełnią funkcję metabolitów wtórnych, wpływających na różne procesy biochemiczne. Wśród najważniejszych funkcji tych związków można wymienić ich udział w ochronie roślin przed patogenami, owadami oraz stresami abiotycznymi, takimi jak promieniowanie UV czy zanieczyszczenia środowiska. W organizmach roślinnych związki fenolowe są również zaangażowane w procesy sygnalizacji międzykomórkowej, regulując różnorodne szlaki metaboliczne. Ich właściwości antyoksydacyjne oraz zdolność do tworzenia wiązań wodorowych czynią związki fenolowe wyjątkowo cennymi w przemyśle. W przemyśle chemicznym związki te są używane m.in. do produkcji tworzyw sztucznych, środków dezynfekujących, a także jako prekursory w syntezie bardziej złożonych związków organicznych, takich jak farmaceutyki czy barwniki. Ponadto, związki fenolowe są szeroko wykorzystywane w przemyśle spożywczym ze względu na ich korzystne właściwości prozdrowotne.

W ostatnich latach związki fenolowe, zwłaszcza flawonoidy, zyskały ogromne znaczenie w kontekście żywienia człowieka, stając się jednym z najważniejszych składników bioaktywnych spożywanych wraz z codzienną dietą. Flawonoidy są obecne w wielu produktach spożywczych, takich jak owoce, warzywa, nasiona roślin strączkowych, orzechy, herbaty oraz wino. W literaturze naukowej wykazano, że związki te mają zdolność do działania jako przeciwutleniacze, przeciwdziałając skutkom stresu oksydacyjnego, który jest jednym z głównych czynników przyczyniających się do starzenia organizmu oraz rozwoju chorób przewlekłych, takich jak nowotwory, choroby sercowo-naczyniowe oraz neurodegeneracyjne. Celem niniejszej pracy badawczej jest zbadanie zależności między strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną wybranych związków fenolowych, takich jak resweratrol, chryzyna, apigenina, kaempferol, kwercetyna oraz mirycetyna, jak również kompleksów tworzonych przez te związki z wybranymi jonami metali. Badania te mają na celu ocenę właściwości biologicznych tych związków w kontekście ich potencjalnego zastosowania w żywieniu funkcjonalnym i specjalistycznym, szczególnie w prewencji chorób oraz wspieraniu zdrowia pacjentów poddawanych terapii onkologicznej. Zakłada się, że tworzenie kompleksów

z metalami może prowadzić do modyfikacji właściwości fizykochemicznych flawonoidów, co w konsekwencji mogłoby poprawić ich biodostępność oraz zwiększyć ich aktywność biologiczną. W szczególności badania mają na celu zrozumienie, w jaki sposób takie modyfikacje wpływają na zdolność flawonoidów do modulowania aktywności leków przeciwnowotworowych oraz ich potencjalne zastosowanie jako składników żywności funkcjonalnej.

W badaniach jako materiał badawczy wykorzystano zarówno czyste flawonoidy, jak i ich kompleksy z wybranymi jonami metali, co pozwoliło na dogłębne zbadanie ich właściwości biologicznych i fizykochemicznych. Do badań wybrano sześć flawonoidów: resweratrol, chryzynę, apigeninę, kaempferol, kwercetynę i mirycetynę. Każdy z tych związków został poddany optymalizacji geometrii molekularnej za pomocą kwantowo-chemicznych metod obliczeniowych. Struktury tych związków pobrano z bazy danych PubChem, a następnie poddano przekształceniu do formatu programu Gaussian (format .gjf) w celu optymalizacji geometrii z użyciem funkcjonału hybrydowego B3LYP z podstawami 6-31G(d,p). Badania te miały na celu uzyskanie najbardziej stabilnych struktur molekularnych, które stanowiły podstawę do dalszych analiz.

Do badań kompleksów flawonoidów z metalami użyto trzech grup metali. Pierwsza grupa obejmowała makroelementy, takie jak sód, potas, magnez i wapń, które pełnią istotne funkcje w organizmach żywych, a ich interakcje z flawonoidami mogą wpływać na równowagę elektrolitową i procesy metaboliczne. Druga grupa to metale zaangażowane w reakcje metaboliczne na poziomie komórkowym, w tym żelazo, mangan, cynk i miedź. Te metale pełnią kluczową rolę w procesach oksydoredukcyjnych i wchodzi w interakcje z flawonoidami, co może zwiększać ich właściwości antyoksydacyjne i modulować ich biodostępność. Trzecią grupę stanowiły metale toksyczne, takie jak ruten, osm, pallad i platyna, które są znane z wyższej toksyczności oraz zdolności do tworzenia stabilnych kompleksów z ligandami. Badania nad tą grupą metali miały na celu zrozumienie, w jaki sposób te interakcje wpływają na właściwości biologiczne flawonoidów, szczególnie w kontekście toksyczności i potencjalnych zanieczyszczeń środowiskowych.

Wszystkie kompleksy ligand-metal poddano optymalizacji geometrii, analizie rozkładu ładunku elektronowego oraz badaniu indeksów aromatyczności. Do optymalizacji użyto funkcjonału B3LYP oraz podstaw 6-31G(d,p) dla ligandów, natomiast dla metali zastosowano pseudopotencjały ECP (Effective Core Potential), co pozwoliło na dokładne odwzorowanie właściwości elektronowych badanych układów. Rozkład ładunku elektronowego w kompleksach analizowano za pomocą analizy populacyjnej NPA (Natural Population Analysis), co umożliwiło ocenę lokalizacji nadmiaru ładunku elektronowego oraz zrozumienie, jak te interakcje wpływają na reaktywność chemiczną ligandów. Indeksy aromatyczności, takie jak HOMA (Harmonic Oscillator Model of Aromaticity), zostały obliczone dla ligandów i ich kompleksów, aby ocenić, jak zmieniają się właściwości aromatyczne w wyniku tworzenia kompleksów z metalami.

Dodatkowo, w badaniach zastosowano obliczenia granicznej gęstości rodnikowej oraz potencjału elektrostatycznego. Obliczenia HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) i LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) pozwoliły na ocenę reaktywności chemicznej

kompleksów oraz ich stabilności. Na podstawie różnicy energii HOMO-LUMO określono stabilność rodnikową badanych kompleksów. Potencjał elektrostatyczny (ESP) został obliczony na powierzchni cząsteczki, co pozwoliło na wizualizację obszarów o zróżnicowanej gęstości ładunku elektronowego. Te analizy miały kluczowe znaczenie dla zrozumienia, jak flawonoidy i ich kompleksy mogą oddziaływać z innymi cząsteczkami, np. białkami lub lekami przeciwnowotworowymi.

W badaniach złożonych właściwości fizykochemicznych uwzględniono również energię dysocjacji wiązań (BDE, Bond Dissociation Energy) oraz funkcję Fukui, co pozwoliło na dokładną ocenę stabilności i reaktywności badanych związków. Obliczenia BDE dostarczyły informacji na temat siły wiązań ligand-metal, a analiza Fukui umożliwiła identyfikację miejsc o największej reaktywności nukleofilowej i elektrofilowej w badanych cząsteczkach. Dalsze badania obejmowały zastosowanie narzędzi obliczeniowych do analizy biodostępności flawonoidów i ich kompleksów. Wykorzystano takie parametry jak TPSA (topologiczna powierzchnia polarna) oraz LogP, co pozwoliło na oszacowanie zdolności cząsteczek do przenikania przez błony biologiczne oraz przewidywania ich absorpcji jelitowej.

3. Aktualna wiedza- przegląd literatury

Związki fenolowe, znane również, jako hydroksybenzeny, stanowią obszerną grupę związków organicznych, charakteryzujących się obecnością grupy hydroksylowej (-OH) bezpośrednio przyłączonej do pierścienia aromatycznego. Związki te wykazują szerokie spektrum właściwości chemicznych i fizycznych, co czyni je interesującymi zarówno z naukowego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Związki te występują powszechnie w przyrodzie - w roślinach i w organizmach zwierzęcych, gdzie pełnią rolę antyoksydantów, chroniąc komórki przed uszkodzeniem oksydacyjnym. W roślinach polifenole są kluczowymi składnikami metabolitów wtórnych. Odgrywają one rolę w obronie przed patogenami oraz w procesach sygnalizacji międzykomórkowej. Związki te mogą być również syntetyzowane przemysłowo i znajdują szerokie zastosowanie w produkcji tworzyw sztucznych, środków dezynfekujących oraz jako prekursory w syntezie bardziej złożonych związków organicznych. Ich unikalne właściwości, takie jak zdolność do tworzenia wiązań wodorowych oraz udział w reakcjach elektrofilowych, sprawiają, że są one przedmiotem intensywnych badań naukowych, mających na celu zrozumienie ich funkcji biologicznych oraz możliwości zastosowań technologicznych (Janabi i wsp., 2020).

W zależności od liczby i rozmieszczenia grup hydroksylowych oraz obecności innych grup funkcyjnych, związki fenolowe mogą przyjmować różne formy strukturalne, co przekłada się na ich różnorodność funkcjonalną. Przykładowo, proste cząsteczki, takie jak hydrochinon, zawierają pojedynczą grupę hydroksylową, podczas gdy polifenole, takie jak kwas galusowy, zawierają wiele grup hydroksylowych, co zwiększa ich zdolność do działania, jako

przeciwutleniacze. Pod względem występowania, związki fenolowe są powszechnie spotykane w świecie roślin, gdzie pełnią różnorodne funkcje biologiczne, w tym ochronę przed szkodnikami i patogenami, udział w procesach wzrostu i rozwoju, a także w reakcjach obronnych przeciwko stresowi oksydacyjnemu. Flawonoidy (tabela 2.), będące jedną z najbardziej zróżnicowanych grup związków fenolowych, występują obficie w owocach, warzywach, herbatach i winie, gdzie odpowiadają za ich barwę, smak oraz nadają wiele właściwości zdrowotnych. Stilbeny (tabela 2.), takie jak resweratrol, można znaleźć w skórkach winogron i niektórych jagodach, a lignany (tabela 2.) są obecne w nasionach lnu, sezamu i niektórych ziarnach zbóż. Kumaryny (tabela 2.) natomiast występują w wielu roślinach aromatycznych, takich jak cynamon czy koper włoski, i są stosowane w medycynie ze względu na swoje właściwości przeciwzakrzepowe. Wszystkie te związki odgrywają kluczową rolę nie tylko w metabolizmie roślin, ale także mają istotne znaczenie dla zdrowia ludzkiego, wykazując szereg właściwości terapeutycznych, takich jak działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe (Kaushal i wsp., 2022).

Tabela 2. Podział związków fenolowych wraz z ich charakterystyką i przykładami (Kaushal i wsp., 2022).

Klasa Związków Fenolowych	Charakterystyka	Przykłady
Proste Fenole	Zawierają jedną grupę hydroksylową przyłączoną do pierścienia benzenowego.	Hydrochinon, Katechol, Resorcinol
Polifenole	Zawierają dwie lub więcej grup hydroksylowych przyłączonych do pierścienia aromatycznego.	Kwas galusowy, Kwas elagowy
Fenolokwasy	Zawierają grupę karboksylową i hydroksylową przyłączone do pierścienia aromatycznego.	Kwas salicylowy, Kwas ferulowy, Kwas kawowy
Flawonoidy	Duża grupa związków fenolowych o strukturze bazującej na szkielecie flawonu. Wyróżnia się kilka podklas.	<i>Flawonole:</i> kwercetyna, kemferol;
		<i>Flawony:</i> apigenina, luteolina;;
		<i>Izoflawony:</i> genisteina, daidzeina
		<i>Flawanony:</i> naryngenina, hesperetyna;
		<i>Flawan-3-ole</i> (katechiny): katechina, epikatechina;
		<i>Antocyjany:</i> cyjanidyna, delfinidyna
Stilbeny	Zawierają dwie grupy hydroksylowe przyłączone do dwóch pierścieni aromatycznych połączonych mostkiem węglowym.	Resweratrol
Lignany	Dimerowe związki fenolowe powstające przez łączenie dwóch jednostek fenolowych.	Sekoizolaricirezinol, Enterolakton
Kumaryny	Związki o strukturze benzo- α -pironu.	Umbeliferon, Eskuletyna

3.1. Związki fenolowe w diecie człowieka

Flawonoidy, będące jedną z najważniejszych grup związków fenolowych, odgrywają istotną rolę w utrzymaniu zdrowia dzięki swoim licznym właściwościom biologicznym i terapeutycznym.

Flawonoidy, spożywane w naturalnej postaci wraz z owocami i warzywami, są nietoksyczne i mogą przynosić znaczące korzyści zdrowotne dla organizmu człowieka. Badania pokazują, że żywność bogata w flawonoidy, taka jak warzywa liściaste i korzeniowe, warzywa strączkowe, owoce jagodowe np. żurawina i jeżyny, są szczególnie korzystna dla zdrowia (Panche i wsp., 2016). Ponadto, inne produkty spożywcze, w tym czerwone i żółte owoce i warzywa, niektóre orzechy oraz produkty takie jak czerwone wino i czekolada, również zawierają znaczne ilości flawonoidów, co wzbudza rosnące zainteresowanie zarówno wśród konsumentów, jak i producentów żywności, dążących do wzbogacania produktów spożywczych w te bioaktywne związki (Panche i wsp., 2016). Flawonoidy wykazują zdolność do neutralizowania wolnych rodników, co chroni komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi (Middleton i wsp., 2000). Dodatkowo, ich działanie przeciwzapalne wynika z modulacji szlaków sygnalizacyjnych w komórkach, w tym inhibicji czynników transkrypcyjnych NF- κ B (ang. *Nuclear Factor kappa B*) i AP-1 (ang. *Activator Protein 1*), które odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi zapalnej (Williams i wsp., 2004).

3.1.1. Działanie prozdrowotne

Najnowsze badania naukowe sugerują, że flawonoidy mogą odgrywać kluczową rolę w profilaktyce zdrowotnej poprzez aktywację enzymów odpowiedzialnych za redukcję ryzyka rozwoju niektórych nowotworów, chorób sercowo-naczyniowych oraz chorób degeneracyjnych związanych z procesem starzenia się. Mechanizmy te obejmują indukcję enzymów detoksykacyjnych, takich jak glutationo-S-transferazy i UDP-glukuronozylotransferazy, które wspierają neutralizację i eliminację potencjalnie szkodliwych substancji chemicznych z organizmu. Działają one także na poziomie komórkowym, modulując aktywność komórek odpornościowych, takich jak limfocyty, makrofagi i komórki NK (ang. *natural killer*), co wspiera odpowiedź immunologiczną i zwiększa zdolność organizmu do eliminacji patogenów (Burkard i wsp., 2017).

Flawonoidy wykazują również zdolność do hamowania utleniania lipoprotein o niskiej gęstości (LDL – ang. *low density lipoproteins*), co zmniejsza ryzyko tworzenia się blaszek miażdżycowych i rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Wzbogacanie żywności w flawonoidy, poprzez dodawanie ekstraktów z roślin bogatych w te związki lub przez procesy technologiczne zwiększające ich biodostępność, staje się coraz bardziej popularne w przemyśle spożywczym. Przykładami takich produktów mogą być soki owocowe, napoje funkcjonalne, batony zbożowe oraz różnego rodzaju suplementy diety. Przykładem zastosowania flawonoidów żywności funkcjonalnej jest opatentowany produkt *Eriomin*, który zawiera ekstrakt flawonoidowy pozyskiwany z cytryn (Farzaei i wsp 2019). Eriomin został

opracowany jako suplement diety mający na celu zarządzanie poziomem glukozy we krwi u osób z predyspozycjami do cukrzycy typu 2. Badania kliniczne wykazały, że Eriomin skutecznie obniża różne wskaźniki związane z insulinoopornością i stresem oksydacyjnym, co czyni go cennym składnikiem żywieniowym w prewencji cukrzycy oraz innych zaburzeń metabolicznych (NCT06005142).

3.1.2. Flawonoidy w prewencji chorób nowotworowych

Jednym z głównych obszarów zainteresowania badaczy jest potencjalne działanie przeciwnowotworowe związków fenolowych. W badaniach Oh, J.K i in. (2015) przeprowadzonych w prospektywnym badaniu kohortowym z udziałem 42099 szwedzkich kobiet w wieku 30–49 lat, z wykorzystaniem FFQ (ang. *food frequency questionnaire*, kwestionariusz częstości spożycia żywności), dane wykazały, że kobiety spożywające dużą ilość kawy (3–4 filiżanki dziennie) miały zmniejszone ryzyko raka piersi (RR: 0,87, 95% CI: 0,76–1,00) (Oh i wsp., 2015). W badaniach epidemiologicznych, takich jak te przeprowadzone przez Zamora-Ros i in. (2013), wykazano odwrotną korelację między spożyciem flawonoidów a ryzykiem wystąpienia raka jelita grubego. W badaniu typu case-control, w którym uczestniczyły 424 osoby chore na raka jelita grubego oraz 401 zdrowych osób z grupy kontrolnej, wykazano, że wysokie spożycie flawonoidów wiąże się z mniejszym ryzykiem zachorowania na ten rodzaj nowotworu (OR: 0,59, 95% CI, 0,35–0,99). Szczególnie istotne okazały się podklasy flawonoidów, takie jak proantocyjanidyny i flawony, które wykazywały silniejszy efekt prewencyjny.

Flawonoidy mogą wywierać swoje działanie przeciwnowotworowe poprzez różne mechanizmy. Przede wszystkim działają jako silne przeciwutleniacze, neutralizując wolne rodniki, które mogą uszkadzać DNA i prowadzić do powstawania nowotworów. Ponadto, flawonoidy mogą wpływać na procesy zapalne, hamując aktywność enzymów takich jak cyklooksigenaza-2 (COX-2; ang. cyclooxygenase-2), które są zaangażowane w promocję nowotworów. Istnieją również dowody, że niektóre flawonoidy mogą indukować apoptozę (programowaną śmierć komórek) w komórkach nowotworowych oraz hamować angiogenezę, czyli tworzenie nowych naczyń krwionośnych, które dostarczają składniki odżywcze do guzów.

Badania nad chemoprewencją wykazały, że mechanizmy działania związków roślinnych i nutraceutyków w zapobieganiu nowotworom wykraczają poza aktywność przeciwutleniającą polegającą na neutralizowaniu wolnych rodników. Obejmują one regulację ekspresji genów związanych z proliferacją komórek, onkogenami i genami supresorowymi nowotworów, indukcję zatrzymania cyklu komórkowego i apoptozy, modulację aktywności enzymów zaangażowanych w detoksykację, utlenianie i redukcję, stymulację układu odpornościowego oraz regulację metabolizmu hormonów. Istnieje ogólne przekonanie, że dodane i synergistyczne efekty związków roślinnych i nutraceutyków obecnych w owocach i warzywach są odpowiedzialne za ich silne działanie przeciwutleniające i przeciwnowotworowe, a korzyści wynikające z diety bogatej w owoce i warzywa przypisuje się złożonej mieszaninie związków roślinnych i nutraceutyków obecnych w całej żywności (Liu, 2004).

Mimo to, nie wszystkie badania jednoznacznie potwierdzają, że ogólne spożycie flawonoidów ma działanie prewencyjne w kontekście nowotworów. Wynika to z różnic w metodologii badań, populacji badanych oraz źródeł flawonoidów w diecie. Niemniej jednak, istnieją przekonujące dowody sugerujące, że wysokie spożycie określonych flawonoidów może obniżyć ryzyko zachorowania na niektóre typy nowotworów, szczególnie tych związanych z układem pokarmowym.

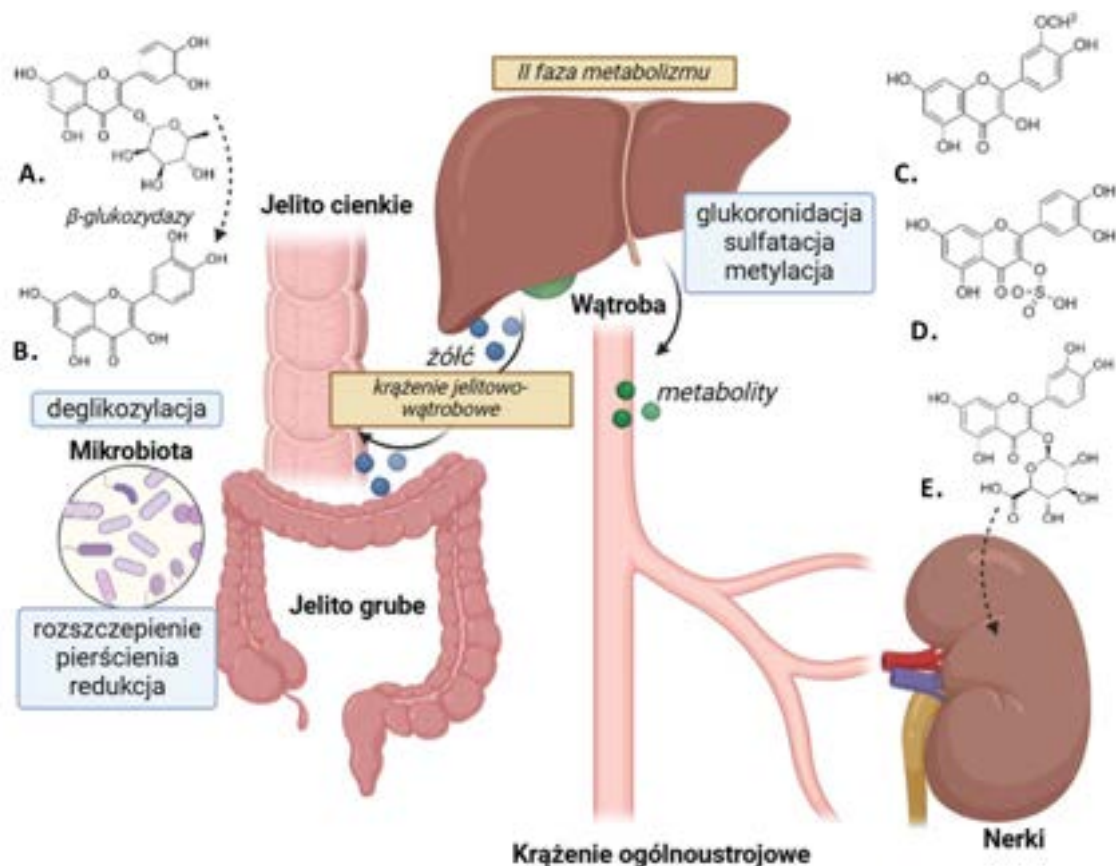
Mechanizmy działania przeciwnowotworowego obejmują indukcję enzymów antyoksydacyjnych, takich jak glutationo-S-transferazy i cytochrom P450, które neutralizują karcynogeny i zmniejszają ryzyko uszkodzeń DNA prowadzących do mutacji (Batra i Sharma, 2013); hamowanie wzrostu komórek nowotworowych poprzez blokowanie cyklu komórkowego, co hamuje ich proliferację, jak na przykład działanie kwercetyny, która indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 (Kuo, 1996); oraz indukcję apoptozy, jak resweratrol, który jest znany z inicjacji programowanej śmierci komórek nowotworowych (Aggarwali wsp., 2004).

Flawonoidy mogą również modulować mikrośrodowisko nowotworowe, zmniejszając stan zapalny i angiogenezę, co ogranicza rozwój i rozprzestrzenianie się nowotworów. Przykładem jest kurkumina, polifenol obecny w kurkumie, która wykazuje zdolności do zmniejszania stanu zapalnego oraz angiogenezy (Anand et al., 2008). Chociaż flawonoidy wykazują szerokie spektrum potencjalnych korzyści zdrowotnych, ich niska biodostępność stanowi istotne wyzwanie w możliwościach aplikacyjnych.

Chociaż flawonoidy mogą wykazywać skuteczność w wysokich stężeniach w modelach komórkowych, osiągnięcie takich poziomów za pomocą konwencjonalnych produktów spożywczych jest trudne. Większość flawonoidów w żywności występuje w formie glikozydów, które są bardziej rozpuszczalne, ale mniej absorbowane niż aglikony.

3.1.3. Metabolizm flawonoidów i ograniczenia w ich biodostępności

Podczas trawienia flawonoidy podlegają metabolizmowi i bioaktywacji już w fazie jamy ustnej dzięki aktywności β -glukozydazy mikrobiomu jamy ustnej. W jelicie cienkim enzymy β -glukozydazy przekształcają glikozydy flawonoidów w ich aglikony, które są następnie absorbowane przez komórki jelitowe (rysunek 1). Aglikony flawonoidów są bardziej biodostępne, ponieważ są wchłaniane przez pasywną absorpcję w nabłonku jelitowym. Po wchłonięciu flawonoidy są transportowane do wątroby, gdzie przechodzą przez metabolizm pierwszego przejścia, obejmujący modyfikacje oksydacyjne i redukcyjne przez enzymy cytochromu P450 (CYP) (rysunek 1).



Rysunek 1. A: Kwercetyna w postaci glikonu (związanej z cukrem) jest najpierw poddawana działaniu enzymów β -glukozydaz, które katalizują proces deglikozylacji w jelicie cienkim, prowadząc do powstania aglikonu kwercetyny (B). B: Aglikon kwercetyny jest następnie metabolizowany przez mikrobiotę jelitową w jelicie grubym, gdzie zachodzi dalsze przekształcanie, w tym rozszczepienie pierścienia i redukcja. Procesy te przygotowują kwercetynę do dalszego metabolizmu w wątrobie. C, D, E: W wątrobie kwercetyna podlega dalszym modyfikacjom w ramach II fazy metabolizmu, gdzie może być zmetylowana (C), glukuronidowana (D), lub poddana sulfatacji (E). Zmetabolizowane formy kwercetyny stają się bardziej rozpuszczalne w wodzie, co ułatwia ich wydalanie przez nerki. Produkty te krążą w krwiobiegu i mogą wywierać swoje biologiczne efekty przed ostatecznym wydalaniem z organizmu.

W fazie II metabolizmu flawonoidy podlegają dalszym modyfikacjom, takim jak metylacja, sulfatyzacja i glukuronidacja. Koniugaty te mogą krążyć w krwiobiegu, gdzie są ostatecznie wydalone z moczem lub ponownie wchodzić do jelit z wydzielaniem żółci. Procesy te odgrywają istotną rolę w biodostępności flawonoidów poprzez różne formy recyklingu (entericzny, entero-wątrobowy i specyficzny dla komórek).

Metabolizm flawonoidów jest również zależny od mikrobiomu jelitowego, który może przekształcać flawonoidy w różne fenolowe metabolity (Rysunek 1). Metabolity te mogą mieć bioaktywność równą lub większą niż ich związki macierzyste, wpływając na zdrowie poprzez regulację mikroflory jelitowej, hamowanie patogennych bakterii i promowanie wzrostu bakterii komensalnych.

W związku z niską biodostępnością, wiele kierunków naukowych rozwija elementy mające na celu zwiększenie biodostępności, a tym samym biologiczne efekty tych naturalnych cząsteczek. Na przykład, modyfikacje w lipofilowości cząsteczek zwiększają wychwyt komórkowy, a tym samym prowadzą do lepszej absorpcji bez utraty ich aktywności. Izomeryzacja i metylacja grup hydroksylowych polifenoli (np. resweratrolu) zmieniają cele molekularne komórki i są kluczowe dla poprawy skuteczności cząsteczki w blokowaniu proliferacji komórek (Williamson i wsp., 2018)

3.2. Znaczenie flawonoidów w technologii żywności, jako składnik żywności funkcjonalnej

Flawonoidy znajdują potencjalne zastosowanie w technologii żywności, szczególnie funkcjonalnej o znaczeniu prewencyjnym. W związku z rosnącym zainteresowaniem bioaktywnymi związkami fenolowymi, aktualnie prowadzone badania skupiają się na dwóch głównych kierunkach: dążeniu do opracowania metod pozwalających na efektywną ekstrakcję i stabilizację polifenoli z roślinnych matryc, co umożliwi ich szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym; oraz opracowaniu nowych technologii zwiększających ich biodostępność.

W kontekście technologii żywności, związki fenolowe odgrywają istotną rolę w kształtowaniu jakości oraz wartości zdrowotnej produktów spożywczych. Przykładem zastosowania związków fenolowych w prewencji nowotworów są przyprawy. Badania przeprowadzone przez Janette Baloghova i współpracowników (2023) wykazały, że związki fenolowe pochodzące z przypraw, takich jak kurkuma czy imbir, mogą mieć istotny potencjał w zapobieganiu i leczeniu raka skóry. Wspomniane przyprawy zawierają bioaktywne polifenole, które mogą działać jako środki zapobiegawcze przeciwko różnym typom raka skóry, w tym czerniakowi i rakowi płaskonabłonkowemu, wskazując na ich zdolność do inhibicji proliferacji komórek nowotworowych oraz ich działanie przeciwutleniające i przeciwzapalne (Baloghova i wsp., 2023).

Giusi Briguglio i współpracownicy (2020) w swojej pracy przeglądowej wskazali, że dieta bogata w produkty zawierające naturalne polifenole może znacząco zmniejszyć ryzyko wystąpienia określonych typów raka. Polifenole, takie jak resweratrol, epigallocatechina galusan (EGCG, ang. *epigallocatechin gallate*) i kurkumina, są szeroko badane pod kątem ich właściwości przeciwutleniających i przeciwzapalnych. Mechanizmy działania tych związków obejmują modulację szlaków sygnałowych związanych z przetrwaniem komórek, ich proliferacją, różnicowaniem, migracją, angiogenezą, aktywnością hormonalną, enzymami detoksykacyjnymi oraz odpowiedziami immunologicznymi. Pomimo obiecującej roli polifenoli w prewencji nowotworów, ich biodostępność po podaniu, jako czyste związki aktywne pozostaje ograniczona. Niemniej jednak, ich skuteczność można zwiększyć poprzez podawanie w połączeniu z innymi związkami pochodzenia naturalnego, lekami przeciwnowotworowymi lub systemami dostarczania opartymi na nanotechnologii (Briguglio i wsp., 2020).

Żywność funkcjonalna odgrywa kluczową rolę w prewencji i terapii nowotworów. Optymalizacja metod produkcji i modyfikacji strukturalnych tych związków jest kluczowa dla zwiększenia ich biodostępności i skuteczności terapeutycznej. W kontekście technologii żywności, nanotechnologia zyskała na znaczeniu, jako narzędzie poprawy stabilności i skuteczności dostarczania związków fenolowych. Vieira i Conte-Junior (2022) przeprowadzili badania dotyczące zastosowania nanotechnologii do enkapsulacji polifenoli, co pozwala na zwiększenie ich biodostępności i efektywności w zwalczaniu różnych typów nowotworów. Systemy takie jak liposomy, nanocząsteczki polimerowe i emulsje nanostrukturalne wykazują zwiększoną aktywność antynowotworową i proapoptotyczną w stosunku do komórek

nowotworowych. Ponadto, niektóre związki fenolowe wykazują obiecujące działanie w terapii skojarzonej ze standardowymi lekami przeciwnowotworowymi, zwiększając efektywność terapeutyczną i zmniejszając skutki uboczne (Vieira, 2022). Polifenole, takie jak kwercetyna, kurkumina i EGCG (ang. *epigallocatechin gallate*), zamknięte w nanomateriałach, wykazują lepszą aktywność antynowotworową i proapoptotyczną w stosunku do komórek nowotworowych. Przedkliniczne badania na modelach zwierzęcych z ksenograftami wykazały zmniejszenie wzrostu nowotworów po zastosowaniu systemów dostarczania zawierających polifenole. Ponadto, współdziałanie systemów dostarczania polifenoli oraz systemów dostarczania leków przeciwnowotworowych wykazuje obiecujące podejście w zwiększaniu aktywności antynowotworowej i zmniejszaniu skutków ubocznych chemioterapii (Vieira, 2023).

Żywność funkcjonalna wzbogacona w flawonoidy ma duży potencjał w prewencji chorób przewlekłych, takich jak choroby sercowo-naczyniowe, nowotwory i choroby neurodegeneracyjne. Wprowadzenie takich produktów do diety może przynieść korzyści zdrowotne, jednak konieczne są dalsze badania, aby lepiej zrozumieć mechanizmy działania flawonoidów oraz ich bezpieczeństwo i skuteczność w długoterminowej prewencji chorób. Indukcja stresu w roślinach, takich jak soja, zwiększa produkcję flawonoidów, co może prowadzić do zwiększenia ich aktywności biologicznej. Przykładem jest patent US2008200537 zgłoszony przez Clevelanda T w 2008 roku, który opisuje zwiększoną biosyntezę izoflawonoidów w soi po stresie. Izoflawonoidy te, w szczególności gliceolliny I, II i III, wykazują silne działanie antyestrogenowe na komórki raka piersi. Badania wykazały, że związki te mogą hamować podstawowe i stymulowane estrogenem tworzenie kolonii komórek raka piersi zależnych od receptora estrogenowego oraz inhibować ekspresję genów zależnych od receptora estrogenowego, takich jak receptor progesteronowy (PgR, ang. progesterone receptor) i czynnik pochodzenia stromalnego-1 (SDF1/CXCL12, ang. *stromal-derived factor 1*). Z tego powodu żywność funkcjonalna wzbogacona we flawonoidy może być szczególnie wartościowa dla populacji narażonych na wysoki poziom hormonozależnych nowotworów, takich jak kobiety po menopauzie oraz osoby z genetycznymi predyspozycjami do raka piersi lub jajnika.

Na rynku istnieje wiele produktów spożywczych wzbogaconych w związki fenolowe, takie jak resweratrol, apigenina czy kaempferol, które wspierają zdrowie serca, układu nerwowego oraz krążenia (tabela 3). Przykładem jest napój suplementacyjny Vivix® zawierający resweratrol, którego zastosowanie opisuje patent US8501229B2, nadany firmie Shaklee Corp. w 2013 roku, dotyczący wzbogacania napojów resweratrolem (tabela 3).

Tabela 3. Zastosowanie wybranych związków fenolowych w technologii żywności oraz przykłady powiązanych patentów

Nazwa związku fenolowego	Przykład zastosowania w technologii żywności	Opis produktu	Numer patentu	Autor patentu
Resweratrol	Napój suplementacyjny	Vivix® - napój zawierający resweratrol oraz inne polifenole, wspierający zdrowie serca i działający przeciwstarzeniowo.	US8501229B2	Shaklee Corp., 2013
Chryzyna	Batonik proteinowy	Batonik proteinowy wzbogacony chryzyną, wspomagający równowagę hormonalną i zdrowie mężczyzn.	US20050239714A1	Now Foods, 2005
Apigenina	Herbata ziołowa	Chamomile Herbal Tea - herbata z dodatkiem apigeniny pochodzącej z rumianku, wspierająca zdrowie układu nerwowego.	US20150306153A1	Celestial Seasonings, 2015
Kaempferol	Herbata zielona	Super Green Tea with Kaempferol - herbata zielona wzbogacona kaempferolem, wspierająca zdrowie układu krążenia.	US8163242B2	Numi Organic Tea, 2012
Kwercetyna	Suplement diety	Q-Force Quercetin Complex - suplement diety zawierający kwercetynę, wspierający zdrowie układu odpornościowego.	US7741371B2	Pure Encapsulations, 2010
Mirycetyna	Suplement diety	Myricetin Plus™ - suplement diety zawierający mirycetynę, wspierający zdrowie mózgu.	EP2449536A1	AOR, 2012

3.3. Modyfikacje chemiczne flawonoidów

Trend w kierunku modyfikacji strukturalnych polifenoli znajduje odzwierciedlenie w licznych patentach, które opisują nowe związki o potencjalnie zwiększonej aktywności biologicznej.

Patent CA2617213 zgłoszony przez Resverlogix Corp w 2007 roku opisuje polifenolopodobne związki inhibujące ekspresję białek adhezyjnych, takich jak VCAM-1 (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*), które odgrywają kluczową rolę w rekrutacji monocytów do ściany naczyń krwionośnych i inicjacji procesu zapalnego. Z kolei zmniejszenie proliferacji komórek mięśni gładkich może ograniczyć przebudowę ścian naczyń krwionośnych, co jest korzystne dla utrzymania ich elastyczności i przepustowości. W kontekście żywienia funkcjonalnego w chorobach sercowo-naczyniowych, takie modyfikacje mogą prowadzić do opracowania nowych suplementów diety, które skuteczniej wspomagają zdrowie układu sercowo-naczyniowego poprzez hamowanie procesów zapalnych i proliferacyjnych związanych z miażdżycą i innymi chorobami serca.

Żywienie funkcjonalne oparte na zmodyfikowanych polifenolach może być kluczowym elementem strategii prewencyjnych i terapeutycznych w chorobach sercowo-naczyniowych, integrując dietetyczne podejście z nowoczesnymi terapiami farmakologicznymi. Dzięki temu żywienie funkcjonalne może stać się bardziej efektywnym narzędziem w walce z chorobami cywilizacyjnymi. Patent CN101072815 opisuje wysokocząsteczkowe polifenole ekstrahowane z fermentowanej herbaty oolong które wykazują działanie terapeutyczne w leczeniu chorób mitochondrialnych oraz cukrzycy. Polifenole te, o średniej masie cząsteczkowej wynoszącej od 9000 do 18000, zawierają strukturę procjanidynową powstałą przez polimeryzację katechiny i/lub jej estrów galusowych. W badaniach wykazano, że te wysokocząsteczkowe polifenole mają zdolność aktywowania mitochondriów, hamowania hiperglikemii oraz przyrostu masy ciała. Dodatkowo mogą być one włączane do żywności funkcjonalnej i napojów, co czyni je atrakcyjnymi składnikami dla przemysłu spożywczego i farmaceutycznego.

Niestety, słaba biodostępność polifenoli, w tym flawonoidów, a także ich nieatrakcyjny, gorzki smak, wymagają zastosowania nowych metod zwiększania stabilności, biodostępności i poprawy profilu sensorycznego. Patent US2008213441 zgłoszony przez C.J. Ludwiga w 2008 roku opisuje mikrokapsułkowanie polifenoli w celu redukcji cierpkości i ochrony przed degradacją poprzez otoczenie cząsteczek polifenoli materiałem kapsułkującym, co pozwala na uwolnienie polifenoli dopiero w układzie trawiennym, minimalizując ich nieprzyjemny smak w jamie ustnej i zapewniając ich lepszą dostępność biologiczną. Innym przykładem zastosowania nośnika jest zgłoszony przez Northwest University jest patent CN101214225 w 2008 roku, który opisuje produkcję nanoemulsji resweratrolu zawierającej surfaktanty, ko-surfaktanty i oleje, które zwiększają stabilność, przedłużają czas półtrwania i poprawiają efektywność antynowotworową poprzez lepszą biodostępność w organizmie.

Synergia działania naturalnych związków z innymi składnikami odżywczymi jest kluczowa dla zwiększenia ich efektywności, co jest szczególnie istotne w kontekście

technologii żywności, gdzie odpowiednie kombinacje składników mogą prowadzić do powstania produktów o wzmocnionych właściwościach prozdrowotnych i lepszej biodostępności substancji czynnych (tabela 4). Patent US2008234361 zgłoszony przez Rimonest Ltd w 2008 roku opisuje mieszaninę sprzężonych kwasów tłuszczowych i polifenoli, takich jak kwas punikowy (ang. *punicic acid*) i kwas elagowy (ang. *ellagic acid*), w leczeniu i profilaktyce otyłości, cukrzycy, nowotworów i chorób serca, które działają synergistycznie, zwiększając efektywność terapeutyczną poprzez połączenie właściwości antyoksydacyjnych i hamujących biosyntezę eikozanoidów - cząsteczek, które odgrywają kluczową rolę w procesach zapalnych i chorobach przewlekłych.

Patent WO2008120220 zgłoszony przez Gangę Raju w 2008 roku opisuje synergistyczny efekt boswelli (konkretnie 3-O-acetyl-11-keto- β -boswellic acid, ang. *3-O-acetyl-11-keto-beta-boswellic acid*) i kurkuminy w specyficznym hamowaniu COX-2 (ang. *cyclooxygenase-2*) i 5-LOX (ang. *5-lipoxygenase*) z działaniem przeciwzapalnym i antyoksydacyjnym, co może znaleźć praktyczne zastosowanie w żywieniu funkcjonalnym w celu wspierania zdrowia stawów, leczenia zapalenia stawów i innych stanów zapalnych.

Inną obiecującą metodą nadania tym związkom nowych właściwości oraz poprawy ich biodostępności jest tworzenie związków kompleksowych z jonami metali. Liczne badania fizykochemiczne koncentrują się na zdolności flawonoidów do interakcji z jonami metali, identyfikacji miejsc chelacji metali, stosunku metalu do ligandu oraz strukturze powstałych kompleksów. Zaobserwowano między innymi, że kompleksy luteoliny z manganem (II) wykazują zwiększoną aktywność antyoksydacyjną i przeciwbakteryjną w porównaniu do wolnej luteoliny. Ponadto, kompleksy te mogą być skuteczniejsze w hamowaniu enzymów takich jak oksydaza ksantynowa (ang. *xanthine oxidase*).

Dotychczasowe badania wskazują, że kompleksowanie flawonoidów z metalami jest obiecującym kierunkiem przyszłych badań, szczególnie w kontekście żywienia funkcjonalnego w onkologii. Badania nad kompleksami kwercetyny z rutenem pokazują, że mogą one indukować apoptozę i fragmentację DNA w komórkach raka jelita grubego (HT-29), zwiększać ekspresję białka p53 oraz obniżać ekspresję VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) i mTOR (ang. *mechanistic target of rapamycin*). Wyniki badań *in vivo* wykazały, że kompleksy te hamują kluczowe czynniki transkrypcyjne oraz zmiany hiperplastyczne, poprawiają poziomy katalazy (CAT, ang. *catalase*), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, ang. *superoxide dismutase*) i glutationu, a także zmniejszają proliferację komórek nowotworowych i zwiększają zdarzenia apoptotyczne poprzez regulację białek Bcl-2 i Bax (Roy et al., 2018). Kompleksy kwercetyny z innymi metalami, takimi jak Fe(II), Cu(II), Mn(II), Zn(II), Tb(III) i Eu(III), również wykazują zwiększoną zdolność wiązania DNA oraz wyższą aktywność cytotoksyczną wobec różnych linii komórkowych raka. Na przykład, kompleksy kwercetyny z Fe(II) i Cu(II) charakteryzują się silniejszym działaniem antyoksydacyjnym i przeciwnowotworowym niż wolne flawonoidy (Tan et al., 2010; Durgo et al., 2011).

Tabela 4. Schemat modyfikacji flawonoidów w kontekście żywienia funkcjonalnego i specjalistycznego

Kategoria	Rodzaj modyfikacji	Opis
Modyfikacje chemiczne struktury flawonoidów	Esterifikacja i amidacja	Zmiany grup funkcyjnych w celu poprawy biodostępności i stabilności w organizmie.
	Glikozylacja	Przłączenie reszt cukrowych do flawonoidów w celu poprawy ich rozpuszczalności i smaku.
	Polimeryzacja	Tworzenie oligomerów i polimerów w celu zwiększenia masy cząsteczkowej i potencjalnie innych właściwości bioaktywnych.
	Modyfikacje w rdzeniu pierścieniowym	Zmiany strukturalne w podstawowej strukturze pierścieni flawonoidowych, takie jak dodanie lub usunięcie grup hydroksylowych, wprowadzenie grup metylowych lub halogenowych.
Tworzenie kompleksów z metalami	Kompleksy z metalami przejściowymi	Tworzenie kompleksów z jonami metali (np. Cu(II), Zn(II), Fe(II), Mn(II)), które mogą zwiększać aktywność antyoksydacyjną i cytotoksyczną.
	Kompleksy z metalami ziem rzadkich	Tworzenie kompleksów z jonami metali, takich jak Tb(III) i Eu(III), które mogą mieć unikalne właściwości biologiczne.
Modyfikacje fizyczne	Mikrokapsułkowanie	Zamykanie flawonoidów w mikrokapsułkach, aby chronić je przed degradacją i poprawić ich biodostępność oraz maskować niepożądany smak.
	Tworzenie nanoemulsji	Użycie nanoemulsji jako nośników w celu zwiększenia stabilności i przedłużenia czasu półtrwania flawonoidów.
Synergia z innymi związkami bioaktywnymi	Łączenie z kwasami tłuszczowymi	Kombinacje flawonoidów z kwasami tłuszczowymi, aby zwiększyć efektywność terapeutyczną, np. w leczeniu chorób przewlekłych.
	Synergia z innymi polifenolami	Połączenia z innymi polifenolami, jak kurkumina, w celu zwiększenia działania antyoksydacyjnego i przeciwzapalnego.

Naringenina, kompleksowana z oksawanadylem (IV, ang. *oxovanadium* (IV)), wykazuje silniejsze działanie antyproliferacyjne niż wolna naringenina, co jest związane z produkowaniem reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*), uszkodzeniem błony komórkowej, degradacją DNA, zatrzymaniem cyklu komórkowego oraz aktywacją kaspaz 3/7. To sugeruje, że kompleksowanie flawonoidów z metalami może poprawić ich aktywność biologiczną (Islas et al., 2015). Kompleksy EGCG (ang. *epigallocatechin gallate*) z jonami Zn^{2+} oraz Cu(II) również wykazują obiecujące właściwości. Zaobserwowano, że związek ten hamuje wzrost komórek raka prostaty (PC-3) w sposób zależny od czasu i dawki, co jest bardziej skuteczne niż stosowanie samego EGCG. Kompleksy EGCG z Cu(II) wykazują zwiększoną aktywność antyoksydacyjną oraz hamowanie aktywności rybonukleazy A (RNase A, ang. *ribonuclease A*), co może sugerować ich potencjał jako substancji antyangiogennych (Chen et al., 2007; Ghosh et al., 2006). Ponadto, kompleksy genisteiny z Cu(II) wykazują zwiększoną cytotoksyczność wobec komórek czerniaka (518A2), a także zmniejszają ekspresję i sekrecję metaloproteinaz (MMP-2 i MMP-9, ang. *matrix metalloproteinases*) i mają zdolność do hamowania cyklu komórkowego w fazie G2/M (Spoerlein et al., 2013).

3.4. Flawonoidy i ich modyfikacje w suplementacji i specjalistycznym żywieniu onkologicznym

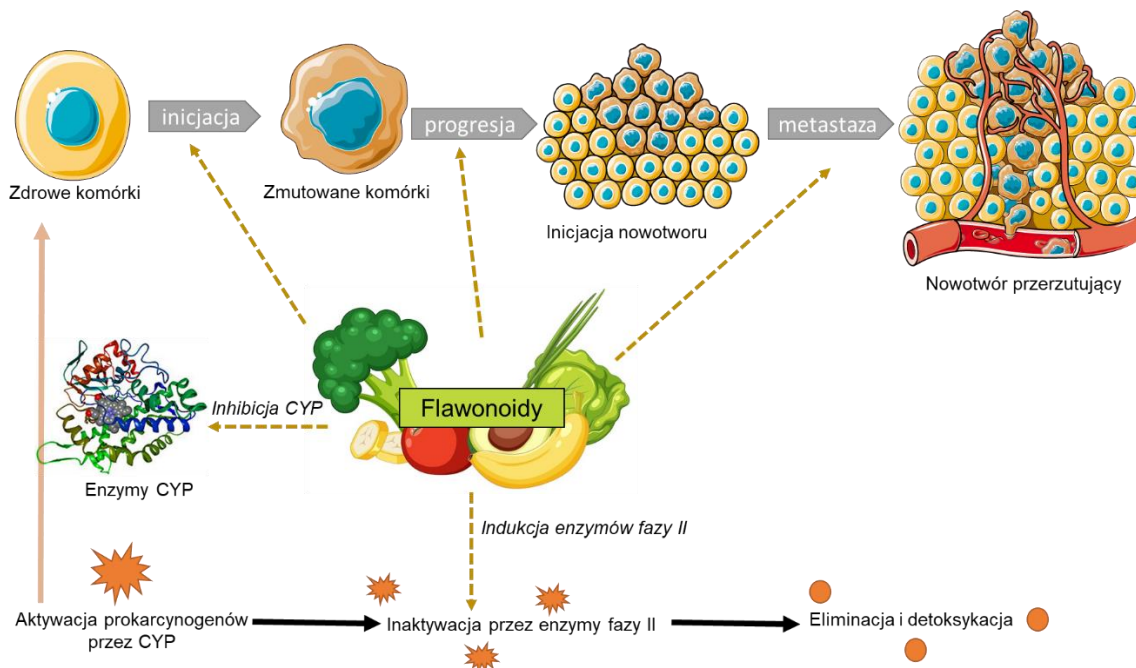
Flawonoidy mogą być stosowane, jako suplementy diety w ramach specjalistycznego żywienia onkologicznego. Ich włączenie do diety pacjentów onkologicznych może wspomagać standardowe terapie, zmniejszając efekty uboczne i poprawiając ogólną, jakość życia pacjentów. Suplementacja flawonoidami może również wspomagać mechanizmy obronne organizmu, zmniejszając ryzyko nawrotu nowotworu oraz wspierając regenerację po zakończonej terapii.

Flawonoidy, takie jak kwercetyna czy naringenina, mogą działać synergistycznie z chemioterapeutykami, zwiększając ich skuteczność i zmniejszając dawki niezbędne do uzyskania efektu terapeutycznego, co minimalizuje skutki uboczne. Dodatkowo, kompleksy flawonoidów z metalami mogą hamować kluczowe ścieżki sygnalizacyjne w komórkach nowotworowych, takie jak szlak PI3K/AKT/mTOR (ang. *phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mechanistic target of rapamycin*), co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego i indukcji apoptozy. Ponadto, flawonoidy wpływają na mechanizmy epigenetyczne, m.in. w nowotworach piersi, zmieniając status metylacji DNA i modyfikacje chromatyny, co może prowadzić do zahamowania progresji i przerzutów nowotworowych (Selvakumar et al., 2020).

Flawonoidy mogą działać, jako silne antyoksydanty, redukując stres oksydacyjny w zdrowych komórkach, jednocześnie promując produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych, co zwiększa ich podatność na chemioterapię. Kompleksowanie z metalami może również zwiększać biodostępność flawonoidów, co umożliwia ich skuteczniejsze dostarczanie do komórek nowotworowych i zdrowych, zapewniając lepszą ochronę przed toksycznymi skutkami leczenia. Flawonoidy wpływają na metabolizm komórek nowotworowych poprzez modulację szlaków metabolicznych. Związki te regulują aktywność enzymów odpowiedzialnych za metabolizm lipidów, takich jak syntaza kwasów tłuszczowych (FAS, ang. fatty acid synthase) i białko SREBP1/2 (ang. sterol regulatory element-binding proteins 1/2), oraz wpływają na równowagę redoks, modulując aktywność czynnika Nrf2 (ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2). Dzięki temu flawonoidy mogą zmniejszać proliferację komórek nowotworowych, hamując ich wzrost. W ten sposób, onkologiczne żywienie może stanowić wsparcie dla standardowych terapii, poprawiając ich efektywność i bezpieczeństwo.

Rossi i współpracownicy wykazali, że spożycie flawononów jest odwrotnie związane z ryzykiem raka przełyku, co może tłumaczyć ochronne działanie owoców, zwłaszcza owoców cytrusowych, w przypadku raka przełyku. Fink i współpracownicy udokumentowali, że spożycie flawonoli, flawonów, flawano-3-oli i lignanów jest związane z obniżonym ryzykiem wystąpienia raka piersi u kobiet po menopauzie. Flawonoidy mają kilka ważnych ról biologicznych, które mogą być związane z ryzykiem raka. Badania in vitro i modele zwierzęce wskazują, że wpływają one na szlaki transdukcji sygnałów, stymulują apoptozę oraz zapobiegają stanom zapalnym i proliferacji w ludzkich liniach komórkowych raka. Izoflawony, posiadające słabą aktywność estrogenową, wykazują dodatkowe korzyści w profilaktyce raka

prostaty. Hamują kinazy tyrozynowe, angiogenezę oraz aktywność 5-alfa-reduktazy, która przekształca testosteron do dihydrotestosteronu. Te mechanizmy mogą tłumaczyć odwrotne zależności między spożyciem izoflawonów a zlokalizowanym rakiem prostaty.



Rysunek. 2. Flawonoidy wykazują aktywność hamującą enzymy CYP, które odgrywają kluczową rolę w aktywacji prokarcynogenów oraz inaktywacji karcynogenów. Poprzez indukcję enzymów fazy II, flawonoidy wspierają proces detoksykacji, co ogranicza ryzyko progresji zmian nowotworowych.

Wybrane flawonoidy mogą zwiększać transkrypcję enzymów detoksyfikujących fazy II, które są zaangażowane w usuwanie prokancerogennych substancji, co wspomaga procesy detoksykacyjne organizmu (Rysunek 2). Enzymy cytochromu P450 (CYP) odgrywają kluczową rolę w metabolizmie ksenobiotyków, w tym leków przeciwnowotworowych. Niektóre flawonoidy, takie jak kwercetyna, naryngenina czy apigenina, wykazują zdolność do inhibicji wybranych izoform CYP, co może wpływać na metabolizm leków stosowanych w terapii onkologicznej. W rezultacie mogą modulować odpowiedź na chemioterapię, zwiększając biodostępność leków i spowalniając ich metabolizm, co może prowadzić do zwiększenia skuteczności terapii oraz zmniejszenia działań niepożądanych.

Flawonoidy wspierają również detoksykację, co jest szczególnie istotne dla pacjentów onkologicznych poddawanych intensywnej chemioterapii i radioterapii. Terapie te, choć skuteczne w niszczeniu komórek nowotworowych, generują liczne produkty uboczne i toksyny, które mogą obciążać organizm pacjenta.

Flawonoidy, jako składniki suplementów diety, mogą być oferowane w różnych wygodnych formach, takich jak kapsułki, tabletki, proszki do rozpuszczania, a także jako

dodatki do żywności funkcjonalnej, w tym batonów energetycznych, jogurtów czy soków. Preparaty flawonoidowe w formie mikrokapsułek umożliwiają kontrolowane uwalnianie, co zwiększa ich biodostępność i minimalizuje nieprzyjemny smak. Dzięki tym różnorodnym formom flawonoidy mogą być łatwo włączone do codziennej diety pacjentów, wspierając ich zdrowie i samopoczucie zarówno w trakcie terapii onkologicznej, jak i po jej zakończeniu.

Jednakże, flawonoidy to bardzo różnorodna grupa związków chemicznych, które mogą być klasyfikowane na podstawie różnic w ich strukturze, w tym obecności i położenia grup hydroksylowych. Różnice te wpływają na ich właściwości chemiczne i biologiczne. Aby opracować skuteczne strategie żywieniowe, ważne jest zidentyfikowanie i wyodrębnienie flawonoidów o najwyższym potencjale prozdrowotnym. Stosowanie mieszanin i ekstraktów roślinnych bogatych w flawonoidy, choć korzystne, nie zawsze pozwala na osiągnięcie celowanego efektu terapeutycznego. Dlatego konieczne jest zbadanie dokładnej struktury poszczególnych flawonoidów oraz ich metalokompleksów. Tylko dzięki precyzyjnym badaniom możemy zidentyfikować flawonoidy o najwyższym potencjale terapeutycznym i opracować formuły suplementów diety o optymalnej skuteczności. Kompleksowanie flawonoidów z jonami metali, takimi jak Fe(II), Cu(II), Zn(II), Mn(II), zwiększa ich biodostępność i efektywność biologiczną. Metalokompleksy mogą wpływać na strukturę i funkcje flawonoidów, co może prowadzić do lepszego zrozumienia ich mechanizmów działania w żywieniu funkcjonalnym.

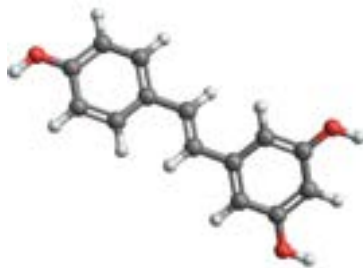
4. Cel i hipotezy badawcze

4.1. Cel badań

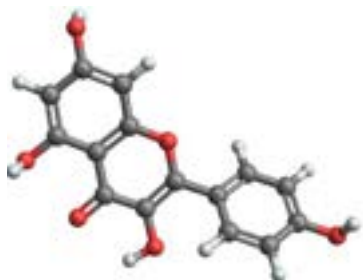
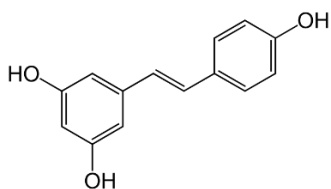
Celem niniejszej pracy badawczej jest zbadanie zależności między strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną wybranych związków fenolowych, takich jak resweratrol, chryzyna, apigenina, kaempferol, kwercetyna oraz mirycetyna (Rysunek 3), jak również kompleksów tworzonych przez te związki z wybranymi jonami metali. Badania te są skierowane na ocenę właściwości tych związków w kontekście ich potencjalnego zastosowania w żywieniu funkcjonalnym i specjalistycznym, z naciskiem na ich rolę w prewencji chorób oraz wspieraniu zdrowia pacjentów poddawanych terapii onkologicznej. Przyjęto, że poprzez utworzenie kompleksów z metalami można modyfikować fizykochemiczne deskryptory biodostępności flawonoidów, co mogłoby prowadzić do poprawy ich właściwości biologicznych. Dodatkowo, badania mają na celu zrozumienie, w jakim stopniu takie modyfikacje wpływają na zdolność flawonoidów do modulowania aktywności leków przeciwnowotworowych oraz ich potencjalne zastosowanie, jako składników żywności funkcjonalnej.

Metale, docelowo użyte w reakcjach kompleksowania umownie podzielono na trzy grupy funkcjonalne:

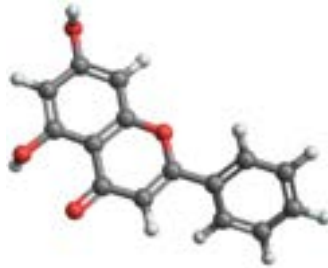
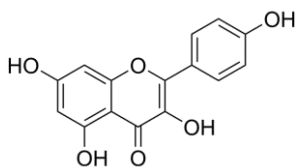
- **Makroelementy:** sód (Na^+ , $r = 102 \text{ pm}$), potas (K^+ , $r = 138 \text{ pm}$), magnez (Mg^{2+} , $r = 72 \text{ pm}$) i wapń (Ca^{2+} , $r = 100 \text{ pm}$). Metale te pełnią istotne funkcje w organizmie, a ich jony często wchodzi w interakcje ze związkami fenolowymi, tworząc dobrze rozpuszczalne sole. W żywności występują jako naturalne składniki mineralne, wpływając na równowagę elektrolitową oraz procesy metaboliczne.
- **Metale zaangażowane w reakcje metaboliczne na poziomie komórkowym:** żelazo (Fe^{3+} , $r = 64,5 \text{ pm}$), mangan (Mn^{4+} , $r = 53 \text{ pm}$), cynk (Zn^{2+} , $r = 74 \text{ pm}$) i miedź (Cu^{2+} , $r = 87 \text{ pm}$). Te metale odgrywają kluczową rolę w enzymatycznych reakcjach oksydoredukcyjnych i metabolizmie komórkowym. W żywności są one obecne w produktach roślinnych i zwierzęcych, wpływając na biodostępność i właściwości antyoksydacyjne związków bioaktywnych, takich jak flawonoidy.
- **Metale toksyczne, stanowiące potencjalne zanieczyszczenia:** ruten (Ru^{3+} , $r = 83 \text{ pm}$), osm (Os^{3+} , $r = 86 \text{ pm}$), pallad (Pd^{2+} , $r = 100 \text{ pm}$) i platyna (Pt^{2+} , $r = 94 \text{ pm}$). Te metale nie występują naturalnie w żywności i są uważane za zanieczyszczenia środowiskowe. W badaniach wykorzystano je jako grupę metali o innych właściwościach niż pozostałe – cechują się wyższą toksycznością oraz zdolnością do tworzenia stabilnych kompleksów z ligandami. W odróżnieniu od metali biologicznych, nie pełnią one żadnych funkcji metabolicznych w organizmach żywych i ich obecność w żywności może być szkodliwa, jeśli wynika z zanieczyszczeń środowiskowych.



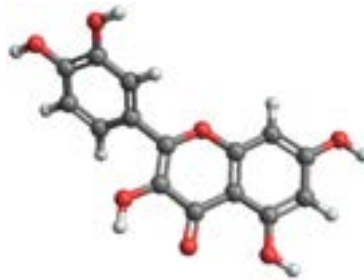
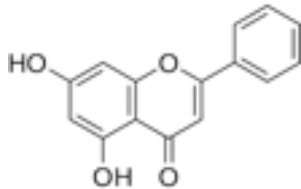
A. Resweratrol (RES)



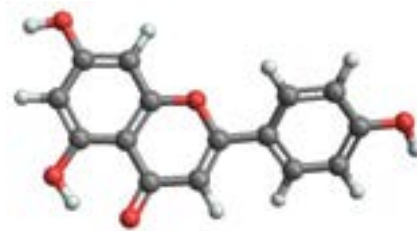
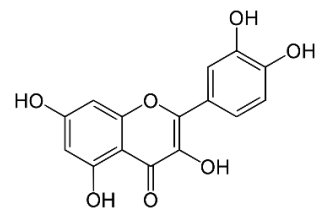
D. Kaempherol (KAM)



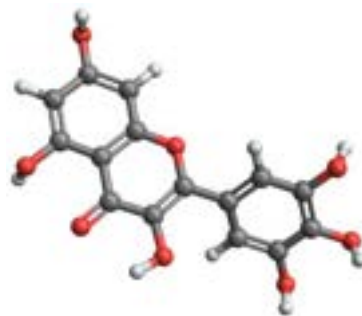
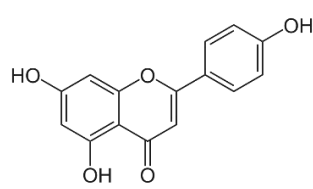
B. Chryzyna (CHRY)



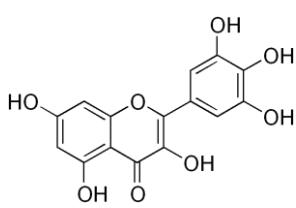
E. Kwercetyna (QUE)



C. Apigenina (API)



F. Mirycetyna (MIR)



Rysunek 3. Struktury badanych ligandów (zoptymalizowane metodą B3LYP/6-31G(d,p) przy użyciu programu Gaussian) oraz ich wzory strukturalne.

4.2. Hipotezy badawcze

- **Hipoteza 1:** Istnieje bezpośrednia korelacja między strukturą chemiczną flawonoidów a ich zdolnością do modulowania aktywności biologicznej, w tym działania antyoksydacyjnego oraz wpływu na procesy komórkowe związane z nowotworzeniem.
- **Hipoteza 2:** Kompleksowanie flawonoidów z jonami metali prowadzi do zmian w ich biodostępności i aktywności biologicznej, co może wpłynąć na ich skuteczność jako składników żywności funkcjonalnej oraz ich potencjalne zastosowanie w terapii onkologicznej.
- **Hipoteza 3:** Modyfikacja strukturalna flawonoidów, poprzez tworzenie kompleksów z metalami, może prowadzić do poprawy ich zdolności do synergistycznego działania z lekami przeciwnowotworowymi, takimi jak doksorubicyna, co może przyczynić się do opracowania bardziej efektywnych strategii żywieniowych wspierających terapię onkologiczną.

4.3. Zadania badawcze

W celu weryfikacji powyższych hipotez przyjęto odpowiedni cel badawczy, a jego realizacja obejmowała następujące zadania badawcze:

- Zbadanie wpływu różnic strukturalnych w cząsteczkach flawonoidów (takich jak resweratrol, chryzyna, apigenina, kaempferol, kwercetyna, mirycetyna) na ich właściwości fizykochemiczne oraz potencjalne oddziaływania w modelach molekularnych.
- Określenie, w jaki sposób modyfikacje strukturalne flawonoidów, w tym tworzenie kompleksów z metalami, wpływają na ich biodostępność w modelach biologicznych oraz ich przenikalność przez błony komórkowe.
- Ocena potencjału przeciwutleniającego i przeciwnowotworowego badanych flawonoidów oraz ich kompleksów z metalami w badaniach in vitro na liniach komórkowych.
- Zbadanie, w jakim stopniu flawonoidy i ich kompleksy z metalami mogą modulować aktywność biologiczną w komórkach nowotworowych, w tym ich wpływ na proliferację, apoptozę oraz sygnalizację komórkową.
- Ocena możliwości zastosowania badanych flawonoidów i ich kompleksów z metalami jako potencjalnych związków chemoprewencyjnych w modelach biodostępności oraz w badaniach nad ich interakcją z komórkami nowotworowymi.
- Zdefiniowanie potencjalnych zastosowań flawonoidów i ich kompleksów z metalami w kontekście wspomagania terapii onkologicznej, poprzez badania nad ich wpływem na mechanizmy komórkowe oraz ich biodostępność w modelach in vitro.
- Porównanie skuteczności flawonoidów w ich naturalnych formach oraz po modyfikacjach chemicznych w kontekście ich stabilności, biodostępności i działania biologicznego w badaniach na liniach komórkowych.

Efekty wykonania powyższych zadań zostały opublikowane w formie artykułów naukowych oraz w formie opisu uzyskanych wyników (Tabela 5).

Tabela 5. Sposób realizacji poszczególnych zadań badawczych

Zadanie badawcze	Sposób realizacji zadania (publikacja/zbiór danych)
Zbadanie wpływu różnic strukturalnych flawonoidów na ich właściwości fizykochemiczne oraz potencjalne oddziaływania w modelach molekularnych.	Zrealizowano i opublikowano w formie publikacji: „Biomaterials in Cancer Therapy: Investigating the Interaction between Kaempferol and Zinc Ions through Computational, Spectroscopic and Biological Analyses” (Golonko et al., 2024, Materials). Analizy: DFT, FT-IR, UV-Vis, NMR (materiały nieopublikowane).
Określenie, w jaki sposób modyfikacje strukturalne flawonoidów, w tym tworzenie kompleksów z metalami, wpływają na ich biodostępność oraz przenikalność przez błony komórkowe.	Zrealizowane i opisane w publikacji „Why do dietary flavonoids have a promising effect as enhancers of anthracyclines? Hydroxyl substituents, bioavailability and biological activity” (Golonko et al., 2022) – analiza literatury, zestawienie tabelaryczne danych, modelowanie biodostępności.
Ocena potencjału przeciwutleniającego i przeciwnowotworowego flawonoidów oraz ich kompleksów z metalami w badaniach in vitro na liniach komórkowych.	Zrealizowano w formie publikacji eksperymentalnych: Golonko et al. 2024 („Apigenin's Modulation of Doxorubicin Efficacy in Breast Cancer”, Molecules, 2024) – testy cytotoksyczności na liniach komórkowych MCF-7 i MDA-MB-231 oraz eksperymenty in vitro oceniające efekty apoptozy i proliferacji.
Zbadanie, w jakim stopniu flawonoidy i ich kompleksy z metalami mogą modulować aktywność biologiczną w komórkach nowotworowych, w tym proliferację, apoptozę oraz sygnalizację komórkową.	Zrealizowano eksperymentalnie i opisano w publikacji "Apigenin's Modulation of Doxorubicin Efficacy in Breast Cancer" (Golonko et al., 2024, Molecules) – badania eksperymentalne na liniach komórkowych, analiza procesów komórkowych, ocena migracji, analiza statystyczna wyników.
Ocena możliwości zastosowania flawonoidów i ich kompleksów z metalami jako potencjalnych związków chemoprewencyjnych.	Zadanie częściowo zrealizowane w publikacji „Dietary factors and their influence on immunotherapy strategies in oncology: a comprehensive review” (Golonko et al., 2024, Cell Death & Disease), omówienie wyników badań eksperymentalnych i klinicznych, oraz zestawienie danych dotyczących interakcji flawonoidów z układem immunologicznym.
Zdefiniowanie potencjalnych zastosowań flawonoidów i ich kompleksów z metalami w kontekście wspomagania terapii onkologicznej, badanie wpływu na mechanizmy komórkowe oraz biodostępność w modelach in vitro.	Zrealizowane poprzez publikację badawczą „Biomaterials in Cancer Therapy: Investigating the Interaction between Kaempferol and Zinc Ions” (Golonko et al., 2024, Materials). Wyniki eksperymentów na liniach komórkowych (MCF-7), badania spektroskopowe (FT-IR, UV-Vis), obliczenia teoretyczne metodą DFT.

5. Część teoretyczna

5.1. Deskryptory fizykochemiczne w ocenie właściwości ligandów

5.1.1. Deskryptory globalne

Globalne deskryptory są istotne dla zrozumienia i przewidywania reaktywności chemicznej, stabilności i innych właściwości związków chemicznych. Są one obliczane i analizowane w kontekście różnych funkcji gęstości elektronowej, co pozwala na dogłębne zrozumienie ich zachowania w różnych warunkach i środowiskach. Globalne deskryptory, w połączeniu z innymi narzędziami obliczeniowymi, stanowią istotny element analizy teoretycznej w chemii. Globalne deskryptory (tabela 3), takie jak globalna elektrofilowość (ω), globalna twardość (η) i globalna elektroujemność (χ), są obliczane zarówno przez procedurę SCF (ang. *Self-Consistent Field*), jak i na podstawie energii orbitalnych HOMO i LUMO (tabela 6).

Tabela 6. Charakterystyka deskryptorów globalnych deskryptorów fizykochemicznych

Parametr	Opis	Znaczenie / interpretacja parametru
HOMO [a.u./eV]	Energia najwyższego zajętego orbitalu molekularnego.	Wyższa wartość wskazuje na większą zdolność do oddawania elektronów. Wpływ na interakcje z receptorami biologicznymi i metabolizm.
LUMO [a.u./eV]	Energia najniższego niezajętego orbitalu molekularnego.	Niższa wartość wskazuje na większą zdolność do przyjmowania elektronów. Znaczenie w analizie reaktywności i toksyczności związku.
Powinowactwo elektronowe	Miara zdolności atomu lub cząsteczki do przyjęcia elektronu.	Wyższa wartość wskazuje na większą zdolność do przyjmowania elektronów. Wpływ na absorpcję i dystrybucję w organizmie.
Potencjał jonizacji	Energia potrzebna do usunięcia elektronu.	Wyższa wartość wskazuje na większą stabilność elektronową. Stabilność związku w środowisku biologicznym.
Elektroujemność	Tendencja atomu do przyciągania elektronów.	Wyższa wartość wskazuje na większą zdolność do przyciągania elektronów. Determinuje interakcje z białkami i innymi makrocząstkami.
Twardość	Odporność na zmiany stanu elektronicznego.	Wyższa wartość wskazuje na większą stabilność chemiczną. Odporność na metabolizm i degradację.
Miękkość	Podatność na zmiany stanu elektronicznego.	Wyższa wartość wskazuje na większą reaktywność chemiczną. Reaktywność i interakcje z celami biologicznymi (tzw. <i>targetami</i>).
eGAP	Różnica energetyczna między HOMO i LUMO.	Niższa wartość wskazuje na większą reaktywność chemiczną. Determinuje reaktywność i toksyczność związku.

Parametr	Opis	Znaczenie / interpretacja parametru
Potencjał chemiczny	Energia związana z dodawaniem/usuwaniem cząsteczek.	Niższa wartość wskazuje na większą reaktywność. Interakcje z receptorami, enzymami itp.
Indeks elektrofilowy	Zdolność do działania jako elektrofil.	Wyższa wartość wskazuje na większą reaktywność wobec nukleofilów oraz silniejsze wiązanie z biomolekułami.
Moc elektrodonorowa	Zdolność do oddawania elektronów.	Wyższa wartość wskazuje na większą zdolność do oddawania elektronów.
Moc elektroakceptorowa	Zdolność do przyjmowania elektronów.	Wyższa wartość wskazuje na większą zdolność do przyjmowania elektronów.
Elektrofilowość <i>Net</i>	Różnica między mocą elektrodonorową a akceptorową.	Wyższa wartość wskazuje na dominację zdolności elektroakceptorowej; osiąga minimum dla stabilnego stanu lub korzystnej reakcji.
Energia RB3LYP	Energia obliczona metodą RB3LYP.	Niższa wartość wskazuje na większą stabilność energetyczną.
Energia punktów zerowych	Energia wibracyjna w stanie podstawowym.	Wyższa wartość może wskazywać na większą stabilność termiczną. Może wpływać na stabilność termiczną związku w organizmie.
Pojemność cieplna przy stałej objętości	Zdolność do przechowywania ciepła.	Wyższa wartość wskazuje na większą zdolność do absorpcji ciepła.
Entropia	Rozproszenie energii.	Wyższa wartość wskazuje na większy stopień nieuporządkowania. Może wpływać na dystrybucję i metabolizm związku.
Wydłużenie wiązania/zgięcie kąta	Energia związana z deformacją wiązań/kątów.	Wyższa wartość wskazuje na większą elastyczność strukturalną.
Torsje	Energia związana z rotacją wokół wiązań.	Wyższa wartość wskazuje na większą elastyczność konformacyjną. Może wpływać na konformację i interakcje z biomolekułami np. białkami docelowymi.
Siły van der Waalsa/Elektrostatyczne	Energia interakcji międzycząsteczkowych.	Wyższa wartość wskazuje na silniejsze oddziaływania niekowalencyjne.
Energia (SCF)	Energia obliczona metodą SCF ¹	Niższa wartość wskazuje na większą stabilność energetyczną.
Norma Gradientu RMS	Miara konwergencji obliczeń.	Niższa wartość wskazuje na większą precyzję obliczeń teoretycznych. Określa precyzję prognoz dotyczących właściwości biologicznych.

¹ Metoda SCF (Self-Consistent Field) to podstawowa technika używana w teoretycznej chemii kwantowej do rozwiązywania równań Schrödingera dla wieloelektronowych systemów. Jest to iteracyjna procedura, której celem jest znalezienie optymalnego pola elektronowego, które jest spójne z rozmieszczeniem elektronów w tym polu.

Parametr	Opis	Znaczenie / interpretacja parametru
Moment dipolowy	Rozkład ładunku.	Wyższa wartość wskazuje na większą polarność cząsteczki. Determinuje rozpuszczalność, absorpcję i dystrybucję związku.
Suma energii elektronowej i termicznej	Ogólna energia systemu.	Niższa wartość wskazuje na większą stabilność energetyczną.
Całkowita energia wolna systemu	Różnica między energią wewnętrzną systemu a energią, która zostaje zużyta na podtrzymanie procesów równowagowych związanych z entropią i temperaturą.	Gdy energia wolna systemu jest niższa, oznacza to, że system ma mniejszą ilość dostępnej energii do wykonania pracy i znajduje się bliżej stanu równowagi.

Metoda SCF jest powszechnie stosowana w obliczeniach kwantowych do analizy i przewidywania właściwości elektronowych i energetycznych cząsteczek. Pomaga w określeniu najstabilniejszej konfiguracji elektronowej i jest podstawą dla bardziej zaawansowanych metod obliczeniowych, takich jak metody post-Hartree-Focka i teoria funkcjonału gęstości (DFT- ang. *Density Functional Theory*), która została wykorzystana w niniejszych badaniach.

Tabela 6. przedstawia analizowane parametry fizykochemiczne, które zostały wykorzystane w analizie zachowania związków chemicznych w kontekście biologicznym. Parametry te, takie jak energia HOMO i LUMO, powinowactwo elektronowe, potencjał jonowy, i inne, są związane z energią reaktywnością i interakcjami molekularnymi związków. Energia HOMO i LUMO jest istotna dla oceny zdolności związku do oddawania i przyjmowania elektronów, co ma bezpośredni wpływ na jego reaktywność i potencjalne interakcje z receptorami biologicznymi. Powinowactwo elektronowe i potencjał jonowy dostarczają informacji na temat stabilności elektronowej, co jest kluczowe dla absorpcji i dystrybucji związku w organizmie. Parametry takie jak elektroujemność, twardość i miękkość chemiczna są związane z odpornością związku na zmiany stanu elektronowego i jego zdolnością do przyciągania elektronów, co ma znaczenie dla interakcji z makrocząsteczkami biologicznymi. eGAP, potencjał chemiczny i indeks elektrofilowy są wskaźnikami reaktywności i potencjalnej siły oddziaływania z makromolekułami biologicznymi.

Moc elektrodonorowa i elektroakceptorowa, a także elektrofilowość *net*, są kluczowe dla oceny równowagi elektronowej i reaktywności związku wobec nukleofilów. Parametry termodynamiczne, takie jak energia RB3LYP, energia punktów zerowych i pojemność cieplna przy stałej objętości, dostarczają wglądu w stabilność energetyczną i termiczną związku. *Net electrophilicity* to koncepcja opisująca stosunek mocy elektroakceptorowej do elektrodonorowej. Jest to miara, która pomaga zrozumieć, jak związek chemiczny będzie reagować z innymi cząsteczkami, zwłaszcza w kontekście jego zdolności do przyjmowania i oddawania elektronów. Wartość *net electrophilicity* często osiąga minimum dla stanu stabilnego lub korzystnej reakcji, co sugeruje, że niższe wartości tego parametru są związane z większą stabilnością i mniejszą reaktywnością związku, może więc mieć znaczenie w analizie

ścieżki danej reakcji. Moc elektrodonorowa (ang. *electrodonating power*, ω^-) i moc elektroakceptorowa (ang. *electroacceptor power*, ω^+) są parametrami wywodzącymi się z koncepcyjnej teorii funkcjonalnej gęstości (CDFT). Są one używane do zrozumienia i opisanie reaktywności chemicznej związków na poziomie molekularnym.

Moc elektrodonorowa (ω^-) odnosi się do zdolności cząsteczki do oddawania ładunku elektrycznego. Jest ona wyrażona za pomocą równania:

$$\omega^- = \frac{(3I + A)^2}{16(I - A)}$$

gdzie I to energia jonizacji (energia potrzebna do usunięcia elektronu z cząsteczki), a A to powinowactwo elektronowe (zdolność cząsteczki do przyjęcia dodatkowego elektronu). Niższe wartości $-\omega^-$ wskazują na większą zdolność cząsteczki do oddawania ładunku. Z kolei moc elektroakceptorowa (ω^+) odnosi się do zdolności cząsteczki do przyjmowania ładunku elektrycznego i jest wyrażona za pomocą równania:

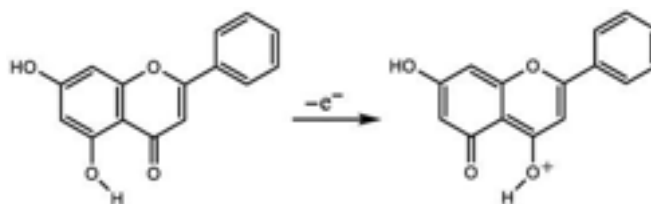
$$\omega^+ = \frac{(I + 3A)^2}{16(I - A)}$$

Wyższe wartości $+\omega^+$ wskazują na większą zdolność cząsteczki do przyjmowania ładunku. Warto zauważyć, że parametry $-\omega^-$ i $+\omega^+$ odnoszą się do transferu ładunku, ale niekoniecznie związane są z transferem jednego elektronu. Są one oparte na prostym modelu transferu ładunku wyrażonym w terminach potencjału chemicznego i twardości. W praktyce, wartości $-\omega^-$ i $+\omega^+$ mogą być użyte do przewidywania i analizowania interakcji chemicznych, w tym reaktywności i stabilności związków chemicznych.

5.1.2. Energia dysocjacji wiązania

Energia dysocjacji wiązania (ang. *bond dissociation energy* (BDE)) jest to jeden z parametrów pomagających w ocenie właściwości antyoksydacyjnych związków chemicznych, w tym flawonoidów. BDE odnosi się do energii potrzebnej do rozerwania konkretnego wiązania w cząsteczce, w kontekście antyoksydantów, najczęściej wiązania O–H. Wartość BDE jest bezpośrednio związana z zdolnością związku do neutralizacji wolnych rodników poprzez mechanizm przenoszenia atomu wodoru (HAT) lub przenoszenia pojedynczego elektronu, a następnie przenoszenia protonu (SETPT). Obliczanie BDE jest procesem teoretycznym, który zazwyczaj wykorzystuje metody teoretyczne, takie jak DFT. Wartości BDE są obliczane dla każdego miejsca O–H. Zaobserwowano, że nie zawsze najniższe wartości BDE(O–H) są zgodne z empirycznie potwierdzonymi właściwościami antyoksydacyjnymi związków. W obliczeniach BDE, wartości energii dysocjacji wiązań O–H są obliczane dla każdego miejsca O–H, a najniższa wartość BDE dla każdego związku jest brana do porównania tych wartości pomiędzy ligandami. Dla flawonoidów zawierających miejsca O–H w pierścieniu B, najniższa wartość BDE zawsze odpowiada jednemu z tych miejsc- grupy hydroksylowe w pierścieniu B są odpowiedzialne za aktywność antyoksydacyjną polifenoli przez mechanizm przenoszenia

wodoru (HAT) (Rysunek 4). W przypadku kompleksu flawonoidu z jonem metalu, obserwuje się zmianę w wartościach BDE i IE (energia jonizacji). Niższe wartości BDE wskazuje na zwiększoną zdolność do przenoszenia atomów wodoru, co jest kluczowym mechanizmem działania przeciwutleniaczy. Z drugiej strony, niższe wartości IE wskazuje na zwiększoną zdolność do donacji elektronów, co również przyczynia się do aktywności przeciwutleniającej.



Rysunek 4. W wyniku jonizacji wodór z grupy OH w neutralnej formie chryzyny przemieszcza się do atomu tlenu grupy karbonylowej (kation).

Znajomość wartości BDE pozwala na określenie, która grupa OH w strukturze flawonoidu jest najbardziej aktywna i najbardziej skłonna do deprotonacji, co jest istotne w procesach takich jak neutralizacja wolnych rodników. Na przykład, aktywne grupy OH, które mają najniższą wartość BDE, są głównymi miejscami, w których zachodzi utlenianie, co pozwala na efektywne przechwytywanie rodników. Związki o wyższej wartości BDE są mniej skłonne do oddawania atomów wodoru, co może ograniczać ich zdolność do działania jako antyoksydanty. Niemniej jednak, mogą one mieć inne mechanizmy działania, takie jak chelatowanie jonów metali, co również przyczynia się do ich właściwości antyoksydacyjnych. W procesie utleniania flawonoidów, grupy OH o najniższej BDE są miejscami, gdzie najprawdopodobniej dochodzi do tworzenia rodników. Rodniki te mogą wchodzić w interakcje z innymi cząsteczkami, prowadząc do dalszych reakcji chemicznych, co ma znaczenie zarówno dla działania ochronnego, jak i potencjalnie prooksydacyjnego (w zależności od warunków).

5.1.3. Deskryptor reaktywności lokalnej- funkcja Fukui

Funkcja Fukui służy jako wskaźnik lokalnej reaktywności chemicznej i jest często wykorzystywana do identyfikacji miejsc nukleofilowych lub elektrofilowych w cząsteczkach. Jest to istotne, ponieważ reaktywność wobec makromolekuł biologicznych oraz działanie przeciwutleniające są zwykle determinowane przez obecność i rozkład tych aktywnych miejsc. Funkcje Fukui, obliczone na podstawie ładunków NBO dostarczają informacji na temat potencjalnych miejsc reakcji i ich typu. W analizie uwzględnia się anion N+1, gdzie elektron jest dodawany do orbitalu LUMO cząsteczki obojętnej, oraz kation N-1, gdzie elektron jest usuwany z orbitalu HOMO cząsteczki obojętnej.

W analizie funkcji Fukui wyróżnia się dwa podstawowe typy ataków chemicznych:

- **Atak nukleofilowy:** Miejsca, gdzie funkcja Fukui ma wartość dodatnią ($\Delta f_k > 0$), są najbardziej podatne na atak nukleofilowy. Oznacza to, że te miejsca są skłonne do przyjmowania elektronów, co jest istotne w reakcjach, gdzie flawonoid działa jako utleniacz, oddając swoje elektrony, np. w reakcjach z rodnikami.
- **Atak elektrofilowy:** Miejsca, gdzie funkcja Fukui ma wartość ujemną ($\Delta f_k < 0$), są bardziej podatne na atak elektrofilowy, czyli oddawanie elektronów. Te miejsca mogą odgrywać kluczową rolę w reakcjach, gdzie flawonoid działa jako antyutleniacz, neutralizując reaktywne formy tlenu.

Dzięki funkcji Fukui możliwe jest precyzyjne określenie, które grupy OH w cząsteczce flawonoidu są najbardziej aktywne biologicznie, co jest istotne dla zrozumienia ich mechanizmów działania. Na przykład, w przypadku flawonoidów takich jak kwercetyna, analiza funkcji Fukui może wskazać, która z grup OH jest najbardziej podatna na utlenianie, co pozwala na przewidywanie, jak flawonoid będzie reagował w środowisku biologicznym.

Funkcja Fukui jest również nieoceniona w kontekście projektowania nowych związków bioaktywnych. Pozwala na optymalizację struktury molekularnej flawonoidów, aby zwiększyć ich efektywność biologiczną, na przykład poprzez poprawę ich biodostępności. Ostateczna identyfikacja najbardziej reaktywnych miejsc w cząsteczce flawonoidu jest wspierana przez analizę powierzchni molekularnego potencjału elektrostatycznego. Ta dodatkowa analiza pozwala na uzyskanie pełniejszego obrazu rozmieszczenia ładunków w cząsteczce, co jest kluczowe dla zrozumienia, jak flawonoid będzie oddziaływał z innymi cząsteczkami w środowisku biologicznym.

5.2. Deskryptory biodostępności flawonoidów i ich znaczenie

Rozpuszczalność flawonoidów odgrywa kluczową rolę w ich skuteczności terapeutycznej. Niska rozpuszczalność aglikonów flawonoidów w wodzie, w połączeniu z krótkim czasem absorpcji w jelicie oraz ograniczonym wchłanianiem, sprawia, że flawonoidy rzadko wywołują ostre efekty toksyczne związane z ich konsumpcją, poza nielicznymi przypadkami alergii. Problem ten często wpływa na ich potencjalne zastosowania lecznicze i żywieniu funkcjonalnym.

W kontekście farmakokinetyki flawonoidów, kluczowe znaczenie mają określone deskryptory biodostępności. Obejmują one między innymi wartość topologicznej powierzchni polarnej (TPSA), liczbę atomów (natoms), masę cząsteczkową (MW), liczbę atomów tlenu i azotu (nON), liczbę grup -OH i -NH (nOHNH), liczbę naruszeń reguły pięciu Lipińskiego (nviolations), liczbę wiązań obrotowych (nrotb) oraz objętość cząsteczkową (volume). Deskryptory te są fundamentalne do oceny właściwości farmakokinetycznych związków chemicznych.

TPSA (Topologiczna Powierzchnia Polarna), wyrażana w $\text{\AA}^2$, obliczana jest na podstawie sumy wkładów fragmentów, uwzględniając fragmenty polarnych związków z centrami na atomach tlenu i azotu. TPSA jest powszechnie używaną miarą w chemii leków, szczególnie w optymalizacji zdolności przenikania leków przez błony komórkowe. Cząsteczki o TPSA większej niż $140 \text{\AA}^2$ zazwyczaj charakteryzują się ograniczoną zdolnością przenikania przez błony, natomiast wartości poniżej $90 \text{\AA}^2$ sprzyjają przenikaniu nawet przez barierę krew-mózg.

Liczba atomów obecnych w cząsteczce (natoms) oraz masa cząsteczkowa (MW) również są istotne w ocenie farmakokinetyki. Natomiast liczba atomów tlenu i azotu (nON) odnosi się do liczby donorów i akceptorów wiązań wodorowych, a liczba grup -OH i -NH (nOHNH) do liczby donorów wiązań wodorowych w cząsteczce.

Reguła pięciu Lipińskiego, stosowana w ocenie podobieństwa związków chemicznych do leków, jest oparta na kilku kryteriach: masie cząsteczkowej (nie większej niż 500 Da), lipofilności (illogP nie większe niż 5), liczbie donorów wiązań wodorowych (HBD nie większe niż 5) oraz liczbie akceptorów wiązań wodorowych (HBA nie większe niż 10). Dodatkowo, wartość refrakcji molowej (MR) powinna mieścić się w zakresie od 40 do 130.

Liczba wiązań obrotowych (nrotb) jest miarą elastyczności cząsteczki, a objętość molekularna (wyrażana w $\text{\AA}^3$) jest obliczana na podstawie wkładów grupowych, co pozwala na określenie kształtu i rozmiaru cząsteczki. Większe cząsteczki mają zazwyczaj niższą biodostępność ze względu na trudności w rozpuszczalności w wodzie, przenikaniu przez błony komórkowe oraz większą podatność na metabolizm i wydalanie.

Optymalizacja tych parametrów, takich jak masa cząsteczkowa i objętość, jest istotnym elementem w procesie syntetyzowania nowych pochodnych, ponieważ wpływa bezpośrednio na ich biodostępność oraz skuteczność biologiczną.

Ponadto, energia obliczona metodą funkcjonału gęstości (DFT) służy do określenia najniższej energii stanu podstawowego cząsteczki. W praktyce oznacza to stabilność energetyczną cząsteczki w warunkach samokonsystentnych. Energia SCF jest związana z

rozkładem elektronów wokół atomów cząsteczki, a im większa objętość molekularna, tym bardziej złożony rozkład elektronowy, co wpływa na wartość energii SCF.

Obliczenia dotyczące właściwości ADMET (wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, wydalenie i toksyczność) są istotne w ocenie potencjalnych zastosowań flawonoidów w żywności, szczególnie w kontekście przenikania przez barierę krew-mózg i wchłaniania z przewodu pokarmowego.

5.3. Właściwości antyoksydacyjne i prooksydacyjne

Antyoksydanty to związki neutralizujące wolne rodniki, zapobiegające procesom oksydacyjnym, które mogą prowadzić do uszkodzenia komórek. Flawonoidy, będące grupą związków o potencjalnych właściwościach przeciwutleniających, są badane pod kątem ich zdolności do neutralizowania reaktywnych form tlenu (ROS) oraz zapobiegania stresowi oksydacyjnemu.

Różne metody pomiarowe pozwalają na określenie zdolności przeciwutleniających i prooksydacyjnych związków chemicznych. Każda z tych metod opiera się na odmiennych zasadach chemicznych i mechanizmach reakcji z wolnymi rodnikami lub prooksydantami. Najczęściej stosowane metody obejmują: DPPH, ABTS, CUPRAC, HORAC, metodę redukcji tlenu azotu (Griessa) oraz utlenianie Troloxu.

Zdolność flawonoidów do działania jako antyoksydanty jest ściśle związana z ich strukturą chemiczną, a w szczególności z liczbą i położeniem grup hydroksylowych oraz układów nienasyconych w pierścieniach aromatycznych. Struktura ta determinuje, jakie mechanizmy neutralizacji wolnych rodników będą dominować i jak skutecznie dany flawonoid będzie pełnił funkcję antyoksydacyjną. Kluczowe mechanizmy, takie jak transfer atomu wodoru (HAT), transfer pojedynczego elektronu (SET) oraz sekwencyjna utrata protonu i transfer elektronu (SPLET), są bezpośrednio zależne od rozmieszczenia grup funkcyjnych w cząsteczce flawonoidu.

Flawonoidy zawierające dużą liczbę grup hydroksylowych, takie jak kwercetyna czy mirycetyna, wykazują szczególnie silne właściwości antyoksydacyjne. W badaniach wykazano, że liczba i rozmieszczenie grup hydroksylowych, zwłaszcza w pozycjach *orto* na pierścieniu B, są kluczowe dla ich aktywności. Kwercetyna, mająca pięć grup hydroksylowych, jest w stanie oddawać atomy wodoru w mechanizmie HAT oraz elektrony w mechanizmie SET, co czyni ją jednym z najsilniejszych flawonoidowych antyoksydantów. Taki mechanizm w dużej mierze odpowiada za obserwowane w badaniach działanie ochronne kwercetyny w kontekście ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym, co potwierdzają badania wykazujące jej zdolność do hamowania peroksydacji lipidów oraz neutralizowania rodników hydroksylowych i nadtlenkowych.

Mirycetyna, zawierająca dodatkową grupę hydroksylową w porównaniu do kwercetyny, wykazuje jeszcze silniejszą aktywność antyoksydacyjną, co wynika z większej zdolności do oddawania protonów i elektronów. Mechanizm SPLET w przypadku mirycetyny odgrywa istotną rolę, ponieważ struktura z wieloma grupami hydroksylowymi sprzyja łatwemu oderwaniu protonów, co zostało potwierdzone w licznych badaniach eksperymentalnych. Obserwowana silna aktywność antyoksydacyjna mirycetyny, zarówno w kontekście ochrony lipidów błon komórkowych, jak i zapobiegania uszkodzeniom DNA, wskazuje, że jej struktura jest optymalna do skutecznego udziału w reakcjach neutralizacji wolnych rodników.

Antocyjaniny, takie jak cyjanidyna, których aktywność również zależy od obecności grup hydroksylowych i nienasyconych układów aromatycznych, cechują się nieco odmiennym mechanizmem działania. Ze względu na swoją strukturę, umożliwiają one łatwy transfer elektronów, co sprawia, że mechanizm SET dominuje w ich aktywności antyoksydacyjnej.

Badania wykazują, że cyjanidyna efektywnie neutralizuje rodniki tlenowe i nadtlenkowe, co ma istotne znaczenie w ochronie naczyń krwionośnych oraz prewencji stanów zapalnych

Wśród najpopularniejszych metod pomiaru zdolności antyoksydacyjnych można wymienić metody takie jak:

5.3.1. Metoda DPPH (2,2-Difenylo-1-pikrylohydrazyl)

Metoda DPPH jest jedną z najpowszechniej stosowanych technik oceny zdolności antyoksydacyjnych. Polega na wykorzystaniu wolnego rodnika DPPH, który ma silne właściwości absorpcyjne przy długości fali 517 nm, co nadaje mu charakterystyczny purpurowy kolor. Antyoksydanty reagują z DPPH, przekazując elektron, co prowadzi do redukcji rodnika i zmiany koloru roztworu na żółty.

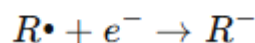
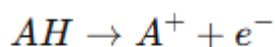
Mechanizm reakcji polega na przeniesieniu atomu wodoru (hydrogen atom transfer, HAT) (Rysunek 5) lub elektronu (single electron transfer, SET) (Rysunek 6) z antyoksydantu na wolny rodnik DPPH. Skuteczność antyoksydantu jest oceniana na podstawie spadku absorpcji, co jest miarą zdolności związków do neutralizowania wolnych rodników.

Metoda HAT:



Rysunek 5. Mechanizm HAT polega na przeniesieniu atomu wodoru z antyoksydantu (AH) na wolny rodnik ($R\bullet$): W tej reakcji antyoksydant oddaje atom wodoru, a powstaje rodnik antyoksydantu ($A\bullet$) oraz zneutralizowany rodnik (RH).

Metoda SET:



Rysunek 6. Mechanizm SET polega na przeniesieniu pojedynczego elektronu z antyoksydantu (AH) na wolny rodnik ($R\bullet$): Najpierw antyoksydant traci elektron, stając się kationem (A^+), a następnie rodnik ($R\bullet$) przyjmuje elektron, neutralizując się.

5.3.2. Metoda ABTS (2,2'-Azylo-bis(3-etylo-benzo-tiazolino-6-sulfonian))

Metoda ABTS opiera się na generowaniu kationowego rodnika $\text{ABTS}^{\bullet+}$, który jest stabilnym rodnikiem i charakteryzuje się niebiesko-zieloną barwą o maksymalnej absorpcji przy 734 nm. Po dodaniu antyoksydantu do roztworu $\text{ABTS}^{\bullet+}$, dochodzi do redukcji rodnika, co powoduje odbarwienie roztworu. Mechanizm działania ABTS polega zarówno na transferze elektronu (SET), jak i transferze atomu wodoru (HAT), co sprawia, że metoda ta jest bardziej uniwersalna niż DPPH. Ze względu na dobrą rozpuszczalność ABTS zarówno w wodzie, jak i rozpuszczalnikach organicznych, metoda ta znajduje szerokie zastosowanie w badaniach nad związkami o różnej polarności.

5.3.3. Metoda CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity)

Metoda CUPRAC opiera się na zdolności antyoksydantów do redukcji jonów miedzi(II) do miedzi(I). W tej metodzie stosuje się chelatujące jony miedzi(II) z neokuproiną (Cu(II)-Nc), które w obecności antyoksydantów ulegają redukcji do formy Cu(I)-Nc , charakteryzującej się maksymalną absorpcją przy 450 nm.

Redukcja miedzi(II) zachodzi przez mechanizm SET, a wynik uzyskiwany jest na podstawie wzrostu absorpcji roztworu po reakcji z antyoksydantem. Metoda CUPRAC cechuje się dużą czułością i prostotą wykonania, a także możliwością stosowania w środowiskach o różnej polarności.

5.3.4. Metoda HORAC (Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity)

Metoda HORAC mierzy zdolność antyoksydantów do neutralizowania rodników hydroksylowych ($\bullet\text{OH}$), jednych z najsilniejszych prooksydantów. Rodniki hydroksylowe są generowane w reakcji Fentona z użyciem nadtlenu wodoru i żelaza(II). Po ich wygenerowaniu, rodniki atakują substrat fluorescencyjny, powodując wygaszenie fluorescencji. Antyoksydanty, neutralizując rodniki hydroksylowe, zapobiegają wygaszeniu fluorescencji, a poziom antyoksydacyjny jest oceniany na podstawie pozostałej intensywności fluorescencji. Metoda HORAC jest szczególnie przydatna do badania związków, które reagują z rodnikami hydroksylowymi poprzez mechanizmy HAT.

5.3.5. Metoda redukcji tlenku azotu (NO) przy użyciu odczynnika Griessa

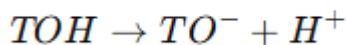
Tlenek azotu (NO) jest reaktywną formą azotu o właściwościach prooksydacyjnych, która może reagować z supertlenkami, tworząc wysoce toksyczne rodniki peroksynitrytu. W tej metodzie, NO generowany w próbkach jest redukowany przez antyoksydanty, co zmniejsza ilość reaktywnego NO dostępnego do reakcji z odczynnikiem Griessa.

Odczynnik Griessa, składający się z sulfanilamidu i N-naftyloetylodwuaminy, reaguje z NO, tworząc różowy związek diazo, którego intensywność jest mierzona spektrofotometrycznie. Zdolność antyoksydantu do neutralizacji NO jest miarą jego aktywności przeciwutleniającej.

5.3.6. Prooksydacyjne utlenianie Troloxu

Trolox, syntetyczny analog witaminy E, jest stosowany jako standard w badaniach antyoksydacyjnych. Jego prooksydacyjne właściwości są wykorzystywane do badania aktywności flawonoidów w obecności reaktywnych form tlenu (ROS). W obecności ROS, Trolox ulega utlenieniu, a stopień tego procesu można mierzyć, oceniając spadek jego stężenia.

Prooksydacyjne utlenianie Troloxu można przedstawić jako reakcję redoks, w której Trolox oddaje atom wodoru ($H^\bullet$) lub elektron (e^-), reagując z ROS, co prowadzi do jego utlenienia do formy rodnikowej (Rysunek 7). Ten proces, zamiast hamować stres oksydacyjny, może prowadzić do nasilenia reakcji oksydacyjnych, polega na sekwencyjnej utracie protonu i transferze elektronu przez Trolox, co prowadzi do jego utlenienia w obecności ROS. W warunkach sprzyjających mechanizmowi SPLET (np. wysokie stężenie ROS), Trolox może działać jako prooksydant, przyspieszając reakcje oksydacyjne i promując generowanie większej ilości reaktywnych form tlenu. W obecności flawonoidów o właściwościach prooksydacyjnych, mechanizm SPLET może być nasilony, co prowadzi do zwiększenia utleniania Troloxu.



Rysunek 7. W pierwszym etapie proton zostaje oderwany z grupy hydroksylowej Troloxu, tworząc anion Troloxu (TO^-). Po oddaniu protonu, anion Troloxu (TO^-) może oddać elektron do ROS. Transfer elektronu do reaktywnej formy tlenu neutralizuje ROS, ale prowadzi do utlenienia Troloxu do formy rodnikowej ($TO^\bullet$), co oznacza, że Trolox przestaje pełnić rolę antyoksydanta, a zamiast tego może uczestniczyć w reakcjach prooksydacyjnych.

5.4. Właściwości przeciwnowotworowe i chemoprewencyjne

Mechanizmy przeciwnowotworowego działania flawonoidów obejmują hamowanie proliferacji, indukcję apoptozy, inhibicję angiogenezy oraz modulowanie układu odpornościowego. Kwercetyna, apigenina i mirycetyna są przykładami flawonoidów, które wykazują silne działanie cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych. Kwercetyna wykazuje zdolność do hamowania kinazy Akt, co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 oraz indukcji apoptozy poprzez aktywację szlaku zależnego od białka p53 i obniżenie ekspresji białek antyapoptotycznych, takich jak Bcl-2 (Lakhanpal i Rai, 2007). Apigenina hamuje ekspresję cykliny D1, co prowadzi do zmniejszenia proliferacji komórek nowotworowych, a także indukuje apoptozę poprzez aktywację kaspaz i destabilizację mitochondriów (Muller et al., 2010). W przypadku mirycetyny, jej zdolność do inhibicji kinaz PI3K/Akt została powiązana z jej działaniem przeciwnowotworowym, szczególnie w odniesieniu do nowotworów o wysokim stopniu agresywności (Li et al., 2018).

Prewencja nowotworu piersi staje się kluczowym elementem strategii zdrowotnych, szczególnie w kontekście rosnącej liczby zachorowań na ten typ nowotworu na całym świecie. Oprócz czynników genetycznych i hormonalnych, styl życia, w tym dieta, odgrywa istotną rolę w zmniejszaniu ryzyka jego rozwoju. Coraz większą uwagę zwraca się na żywienie funkcjonalne, które nie tylko dostarcza niezbędnych składników odżywczych, ale także oferuje biologicznie aktywne związki, takie jak flawonoidy, wspomagające ochronę przed stresem oksydacyjnym i procesami zapalnymi, kluczowymi w kancerogenezie. W kontekście leczenia onkologicznego pacjentów z nowotworem piersi, wdrożenie żywienia funkcjonalnego może stanowić istotne wsparcie terapeutyczne, poprawiając ogólny stan zdrowia, wspierając układ odpornościowy oraz redukując skutki uboczne związane z terapią.

W celu oceny skuteczności flawonoidów w kontekście przeciwnowotworowym stosowane są różnorodne testy biologiczne, z których jednym z najbardziej powszechnych jest test MTT. Test ten umożliwia ocenę żywotności komórek poprzez pomiar aktywności mitochondrialnych dehydrogenaz, które redukują MTT do fioletowego formazanu w komórkach żywych. Proces ten nie zachodzi w martwych komórkach, co pozwala na precyzyjne określenie stopnia cytotoksyczności badanych związków wobec komórek nowotworowych (Mosmann, 1983). Test MTT jest powszechnie stosowany w badaniach na liniach komórkowych nowotworów piersi, takich jak MCF-7 oraz MDA-MB-231.

Wybór linii komórkowych MCF-7 oraz MDA-MB-231 w badaniach nad flawonoidami nie jest przypadkowy. MCF-7 to linia komórkowa reprezentująca raka piersi zależnego od hormonów, charakteryzująca się ekspresją receptorów estrogenowych (ER+). Ta linia komórkowa jest szczególnie użyteczna w badaniach nad nowotworami, które reagują na terapię hormonalną, ponieważ pozwala na ocenę wpływu flawonoidów na szlaki zależne od estrogenów. W badaniach na liniach MCF-7 wykazano, że kwercetyna i apigenina mogą modulować ekspresję receptorów estrogenowych, wpływając na wzrost nowotworów zależnych od estrogenów (Srinivasan i Rajendra, 2018).

Z kolei linia MDA-MB-231 to model potrójnie negatywnego raka piersi (TNBC), charakteryzującego się brakiem receptorów estrogenowych, progesteronowych oraz HER2. TNBC jest trudnym do leczenia typem nowotworu, gdyż nie reaguje na standardowe terapie hormonalne czy celowane, takie jak inhibitory HER2. W badaniach wykazano, że flawonoidy, takie jak kwercetyna i mirycetyna, mogą hamować proliferację komórek MDA-MB-231 poprzez indukcję apoptozy oraz hamowanie ścieżek sygnałowych PI3K/Akt i MAPK, co potwierdza ich potencjał w leczeniu tego trudnego do leczenia typu nowotworu (Pawlikowska-Pawlega et al., 2019).

6. Metody badawcze

6.1. Chemia teoretyczna (obliczeniowa)

W ramach niniejszej pracy wykonano szereg obliczeń kwantowo-chemicznych mających na celu zbadanie właściwości kompleksów metali z wybranymi ligandami, przy wykorzystaniu programu Gaussian oraz funkcjonału hybrydowego B3LYP. Poniżej szczegółowo opisano etapy obliczeń, w tym optymalizację geometrii, analizę rozkładu ładunku elektronowego, indeksów aromatyczności, granicznej gęstości rodnikowej, potencjału elektrostatycznego, energii dysocjacji wiązania (BDE) oraz funkcji Fukui.

6.1.1. Przygotowanie struktur wejściowych

Struktury ligandów, takich jak resweratrol, chryzyna, apigenina, kaempferol, kwercetyna oraz mirycetyna, zostały pobrane z bazy danych PubChem w formacie SDF (Structure Data File). Format SDF jest standardowym formatem plików wykorzystywanym do przechowywania informacji o strukturach chemicznych, w tym przestrzennych współrzędnych atomów.

Struktury te zostały najpierw poddane ręcznej inspekcji i przekształceniu do formatu programu Gaussian (format .gjf). Następnie wykonano optymalizację geometrii dla samych ligandów oraz ich kompleksów z metalami, przy użyciu poziomu teorii B3LYP z podstawami 6-31G(d,p) dla ligandów oraz pseudopotencjałami ECP (Effective Core Potential) dla atomów metali. W przypadku metali ciężkich zastosowano odpowiednie zestawy baz (np. LANL2DZ).

6.1.2. Optymalizacja geometrii

Optymalizację geometrii przeprowadzono z wykorzystaniem funkcjonału B3LYP (Becke's three-parameter exchange function, combined with the Lee-Yang-Parr correlation function), który jest szeroko stosowany w badaniach nad układami zawierającymi metale przejściowe. Podstawy 6-31G(d,p) oraz ich rozszerzone wersje z dyfuzyjnymi funkcjami polaryzacyjnymi (np. 6-311++G(d,p)) zostały zastosowane, aby zapewnić dokładność w opisie rozkładu elektronów w dużych układach molekularnych.

Wszystkie obliczenia optymalizacyjne zostały wykonane przy założeniu stanu podstawowego oraz bez założenia żadnych symetrii (opcja *NoSymm* w Gaussian), aby uniknąć niepotrzebnych ograniczeń symetrii geometrycznej w procesie optymalizacji. Proces optymalizacji został wykonany do uzyskania minimalnych wartości energii, które spełniały warunki konwergencji na poziomie gradientu oraz energii całkowitej.

6.1.3. Obliczenia rozkładu ładunku elektronowego (NPA)

Rozkład ładunku elektronowego na poszczególnych atomach kompleksów ligand-metal analizowano za pomocą analizy populacyjnej Natural Population Analysis (NPA). Analiza ta pozwala uzyskać wartości ładunków na atomach na podstawie funkcji falowej z obliczeń kwantowo-chemicznych.

Do wykonania analizy NPA użyto wbudowanej w Gaussian metody NBO (Natural Bond Orbital). Uzyskane wyniki pozwalają na określenie lokalizacji nadmiaru ładunku elektronowego, co jest istotne dla zrozumienia właściwości elektronowych i reaktywności ligandów w kompleksach metali.

6.1.4. Indeksy aromatyczności

Aromatyczność wybranych układów analizowano za pomocą obliczeń indeksów aromatyczności, takich jak Harmonic Oscillator Model of Aromaticity (HOMA). Do obliczeń indeksu HOMA wykorzystano optymalizowane geometrie ligandów, z których wyliczono długości wiązań w pierścieniach aromatycznych. Obliczenia przeprowadzono na poziomie B3LYP/6-31G(d,p), co zapewnia dobrą zgodność z wynikami eksperymentalnymi.

6.1.5. Graniczna gęstość rodnikowa

Aby ocenić graniczną gęstość rodnikową badanych kompleksów, wykonano obliczenia energii HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) i LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Te energie są kluczowe w określeniu reaktywności chemicznej oraz potencjalnych miejsc ataku rodnikowego. Graniczną gęstość rodnikową wyznaczono poprzez różnicę między energiami HOMO i LUMO (tzw. *gap energetyczny*), co pozwala na określenie stabilności rodnikowej badanych układów.

Wizualizacja granicznej gęstości rodnikowej została wykonana z wykorzystaniem platformy WebMO. Nałożono obliczone powierzchnie elektronowej gęstości granicznej (HOMO i LUMO) na optymalizowane geometrie ligandów, co umożliwiło wizualną ocenę miejsc aktywności chemicznej w badanych cząsteczkach.

6.1.6. Potencjał elektrostatyczny

Rozkład potencjału elektrostatycznego (ESP) na powierzchni cząsteczki obliczono, aby zidentyfikować obszary o różnej gęstości ładunku elektronowego, co pozwala na lepsze zrozumienie interakcji elektrostatycznych pomiędzy ligandem a środowiskiem (np. białkiem lub innymi ligandami). Do wyznaczenia potencjału elektrostatycznego użyto funkcji *Molecular Electrostatic Potential (MEP)* w programie Gaussian, co umożliwiło zobrazowanie potencjałów na powierzchni izoelektronowej cząsteczki.

Podobnie jak w przypadku granicznej gęstości rodnikowej, potencjał elektrostatyczny został zwizualizowany na platformie *WebMO*. (<https://www.webmo.net/z> dn. 24.09.24) Nałożono izopowierzchnie potencjału elektrostatycznego na zoptymalizowaną geometrię cząsteczki, co pozwoliło na identyfikację obszarów o różnym charakterze ładunku.

6.1.7. Energia dysocjacji wiązania (BDE)

Energia dysocjacji wiązania (BDE, *Bond Dissociation Energy*) została obliczona dla wiązań kluczowych dla stabilności kompleksów ligand-metal. Obliczenia te wykonano poprzez wyznaczenie różnicy energii pomiędzy układem w stanie związanym a produktem dysocjacji wiązania. W obliczeniach BDE stosowano podejście opierające się na optymalizacji geometrii zarówno układu wyjściowego, jak i produktów dysocjacji.

6.1.8. Funkcja Fukui

Funkcje Fukui wyznaczono na podstawie obliczeń kwantowo-chemicznych dla stanów zredukowanych oraz utlenionych kompleksów ligand-metal, wykorzystując definicję Fukui jako pochodną gęstości elektronowej względem liczby elektronów. Do obliczeń funkcji Fukui wykorzystano metodykę B3LYP, a wyniki posłużyły do wyznaczenia miejsc o największej reaktywności nukleofilowej i elektrofilowej w badanych układach.

6.2. Metody badania biodostępności

W badaniu zastosowano szereg metod obliczeniowych do analizy biodostępności flawonoidów, uwzględniając takie parametry, jak rozpuszczalność, współczynnik lipofilowości (LogP) oraz właściwości farmakokinetyczne, takie jak absorpcja jelitowa czy przenikanie przez barierę krew-mózg. Wykorzystano następujące narzędzia oraz podejścia obliczeniowe:

SwissADME to platforma obliczeniowa, która została zastosowana do przewidywania właściwości fizykochemicznych oraz farmakokinetycznych badanych związków. W ramach tego narzędzia obliczono:

6.2.1. TPSA (Topologiczna Powierzchnia Polarna)

Obliczenia TPSA zostały przeprowadzone na podstawie metodologii fragmentowej zaproponowanej przez Ertla i współpracowników. Wartości TPSA są sumą wkładów polarnych atomów (głównie tlenu i azotu), a ich jednostką są $\text{\AA}^2$. Fragmenty te zostały zdefiniowane w oparciu o wcześniejsze badania dotyczące wpływu polarności na wchłanianie leków.

6.2.2. LogP (Współczynnik podziału oktanol-woda)

Lipofilowość cząsteczki obliczono na podstawie kilku metod, w tym:

- **WLOGP:** Jest to metoda fragmentalna, w której sumuje się lipofilowe wkłady poszczególnych fragmentów molekularnych. Każdy fragment cząsteczki ma przypisane wartości na podstawie dużej bazy danych zawierającej informacje o znanych związkach.
- **Consensus LogP:** Średnia arytmetyczna obliczeń LogP uzyskanych przy użyciu różnych algorytmów (w tym WLOGP i iLOGP). Użyto kilku metod w celu uzyskania bardziej dokładnych i zróżnicowanych wyników.

6.2.3. Reguła Lipińskiego

Do oceny potencjalnych właściwości farmakokinetycznych zastosowano tzw. "regułę pięciu Lipińskiego". Oceniano takie parametry, jak masa cząsteczkowa (MW), liczba donorów (HBD) i akceptorów (HBA) wiązań wodorowych oraz LogP. Reguła Lipińskiego polega na sprawdzeniu, czy związek narusza więcej niż dwa z czterech kryteriów (masa cząsteczkowa ≥ 500 Da, LogP ≥ 5 , HBD ≥ 5 , HBA ≥ 10).

6.2.4. Stopień absorpcji jelitowej

Absorpcja jelitowa została oszacowana na podstawie wartości TPSA. Obliczenia procentu absorpcji (%ABS) dokonano na podstawie wzoru:

$$\%ABS = 109 - (0,345 \times TPSA),$$

gdzie TPSA jest wyrażona w Å². Wzór ten opiera się na empirycznych danych uzyskanych z badań absorpcji w przewodzie pokarmowym.

6.2.5. Metoda "Boiled Egg"

Do oceny absorpcji jelitowej oraz zdolności przenikania przez barierę krew-mózg zastosowano metodę graficzną "Boiled Egg", dostępną w narzędziu SwissADME. Metoda ta opiera się na dwóch deskryptorach:

- WLOGP- Wartości współczynnika podziału oktanol-woda obliczono metodą fragmentalną, w której każdy fragment cząsteczki przyczynia się do całkowitej lipofilowości.
- TPSA- Obliczenia TPSA, które już wcześniej opisano, wykorzystywane są do przewidywania przepuszczalności przez błony biologiczne.

Na wykresach typu "Boiled Egg" każda cząsteczka jest przedstawiona jako punkt. Biała strefa reprezentuje wysokie prawdopodobieństwo absorpcji jelitowej, natomiast żółta strefa wskazuje na możliwość przenikania przez barierę krew-mózg.

6.2.6. Model rozpuszczalności ESOL

Rozpuszczalność flawonoidów w wodzie obliczono przy użyciu modelu **ESOL**, który opiera się na regresji liniowej. Model ten uwzględnia takie parametry, jak:

- TPSA- Im większa powierzchnia polarna cząsteczki, tym mniejsza jej rozpuszczalność w wodzie.
- MW (Masa cząsteczkowa)- Większe cząsteczki mają zwykle niższą rozpuszczalność.

Liczba donorów i akceptorów wiązań wodorowych: Zwiększona liczba grup OH i NH ma wpływ na zwiększenie zdolności do tworzenia wiązań wodorowych z wodą.

Wartości logarytmu rozpuszczalności (Log S) są obliczane na podstawie wzoru:

$$\text{Log S} = 0,16 - 0,63 \times \text{LogP} - 0,0062 \times \text{MW} + 0,066 \times \text{nrotb} - 0,74 \times \text{AR}$$

gdzie MW jest masą cząsteczkową, a TPSA jest powierzchnią polarną, AR (Aromatic Rings) - liczba pierścieni aromatycznych, które zmniejszają rozpuszczalność, ponieważ są one bardziej lipofilowe i mniej zdolne do interakcji z wodą poprzez tworzenie wiązań wodorowych.

6.2.7. Liczba wiązań obrotowych (nrotb)

Obliczenia dotyczące liczby wiązań obrotowych (nrotb) opierały się na identyfikacji liczby pojedynczych wiązań niewchodzących w skład pierścieni, które są połączone z ciężkimi atomami (atomy inne niż wodór). Każde takie wiązanie stanowi miarę elastyczności cząsteczki, co może wpływać na biodostępność leku. Mniejsze wartości nrotb wskazują na większą sztywność cząsteczki, co często koreluje z lepszą biodostępnością.

6.3. Metody badania właściwości antyoksydacyjnych

6.3.1. Metoda DPPH

Metoda DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-hydrate) została zastosowana do oceny aktywności antyoksydacyjnej badanych substancji. Roztwór DPPH przygotowano poprzez rozpuszczenie 24 mg stałego DPPH w 100 mL metanolu, uzyskując roztwór wyjściowy, który następnie rozcieńczono pięciokrotnie w metanolu. Na płytkę 96-dołkową naniesiono 15 μ L roztworu badanej substancji, po czym dodano 285 μ L roboczego roztworu DPPH. Próbkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Absorbancję zmierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 517 nm. Jako wzorec referencyjny zastosowano kwas askorbinowy. Wyniki wyrażono jako ekwiwalent witaminy C (VCEAC), który pozwala na porównanie zdolności antyoksydacyjnych badanych substancji.

6.3.2. Metoda ABTS

Metoda ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) została wykorzystana do badania aktywności antyoksydacyjnej ligandów i metalokompleksów. Roztwór rodnika ABTS+ przygotowano poprzez zmieszanie równych objętości 7 mM roztworu ABTS z 2,45 mM roztworem nadsiarczanu potasu. Mieszaninę inkubowano przez 12-16 godzin w ciemności, w temperaturze pokojowej. Przed użyciem, roztwór rozcieńczono etanolem do absorbancji 0,7 ($\pm$ 0,02) przy długości fali 734 nm. Na płytkę 96-dołkową dodano 240 μ L roztworu ABTS+ i 10 μ L badanej substancji. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie przy 734 nm przy użyciu spektrofotometru Biotek Synergy H1. Wyniki przeliczono na ekwiwalent zdolności antyoksydacyjnej witaminy C (VCEAC).

6.3.3. Metoda CUPRAC

Metoda CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) służyła do oceny zdolności antyoksydacyjnej badanych próbek poprzez redukcję jonów Cu(II) do Cu(I). Do każdej próbki dodano reagent CUPRAC, który stanowi kompleks Cu(II)-neokuproiny. Powstały chromofor Cu(I)-neokuproiny mierzy się przy długości fali 450 nm. Test przeprowadzono w warunkach kontrolnych, stosując Trolox jako wzorec, a wyniki wyrażono jako ekwiwalent zdolności antyoksydacyjnej w odniesieniu do Troloxu (TEAC). Absorbancję zmierzono przy długości fali 450 nm przy użyciu spektrofotometru Biotek Synergy H1\

6.3.4. Metoda HORAC

W metodzie HORAC oceniano zdolność próbek do neutralizowania rodników hydroksylowych. Rodniki te generowano poprzez reakcję jonów kobaltu(II) z nadtlaniem wodoru, co prowadziło do degradacji sygnału fluorescencyjnego fluoresceiny. Do każdej próbki dodano 100 μL fluoresceiny i 10 μL badanej substancji, a następnie inkubowano próbki przez 45 minut. Intensywność fluorescencji mierzono przy długości fali wzbudzenia 485 nm i emisji przy 535 nm, a wyniki analizowano na podstawie obszaru pod krzywą (AUC). Wartości odniesiono do wzorca w postaci kwasu galusowego.

6.3.5. Metoda redukcji tlenku azotu

Metodę redukcji rodnika tlenku azotu ($\text{NO}\bullet$) przeprowadzono na podstawie reakcji Griessa. Tlenek azotu generowano poprzez rozkład nitroprusydku sodu, który reagował z tlenem, tworząc jony azotynowe. Do każdego dołka płytki 96-dołkowej dodano 50 μL badanej substancji oraz 10 μL roztworu nitroprusydku sodu. Po inkubacji przez 90 minut, do każdego dołka dodano 100 μL odczynnika Griessa. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 546 nm przy użyciu spektrofotometru Biotek Synergy H1.

6.3.6. Prooksydacyjne utlenianie Troloxu

Do oceny aktywności prooksydacyjnej wykorzystano Trolox jako wzorzec. Roztwór Trolox (100 μM) mieszano z H_2O_2 (50 μM), peroksydazą chrzanową (HRP, 0,01 μM) oraz badanymi substancjami w odpowiednich stężeniach. Absorbancję mierzono po 30 minutach inkubacji przy długości fali 272 nm przy użyciu spektrofotometru Biotek Synergy H1.

6.4. Metody badania właściwości cytotoksycznych

6.4.1. Przygotowanie próbek

Do oceny cytotoksyczności badanych ligandów i metalokompleksów zastosowano linie komórkowe MCF-7 oraz MDA-MB-231. Ligandy flawonoidów (resweratrol, apigenina, kaempferol, kwercetyna, mirycetyna) oraz ich metalokompleksy przygotowano w zakresie stężeń od 12,5 μM do 200 μM . Do przygotowania próbek użyto roztworu dimetylosulfotlenku (DMSO) w stężeniu <1%. Jako kontrolę ujemną wykorzystano komórki traktowane wyłącznie DMSO w stężeniu <1%, a jako kontrolę pozytywną – komórki traktowane dokсорubicyną w odpowiednich stężeniach.

6.4.2. Warunki hodowli komórek

Komórki linii MCF-7 i MDA-MB-231 hodowano w standardowych warunkach inkubacyjnych (37°C, 5% CO₂, wilgotność 95%). Komórki inkubowano przez 24 godziny z różnymi stężeniami badanych ligandów i ich metalokompleksów w pożywce zawierającej 10% FBS (surowica płodowa cielęca) oraz antybiotyki (penicylina i streptomycyna). Hodowlę prowadzono w odpowiednich płytkach hodowlanych z 96 dołkami.

6.4.3. Pomiar cytotoksyczności

Do oceny cytotoksyczności zastosowano test MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami do każdego dołka dodano 20 μL roztworu MTT (5 mg/mL w PBS) i inkubowano komórki przez kolejne 3 godziny w 37°C. Następnie medium usunięto, a osad formazanu rozpuszczono w 100 μL DMSO. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 570 nm z użyciem spektrofotometru Biotek Synergy_H1.

6.4.4. Analiza danych

Procent żywotności komórek wyrażono w odniesieniu do próby kontrolnej (komórki traktowane wyłącznie DMSO). Wyniki obliczono według wzoru:

$$\% \text{ żywotności} = \left(\frac{A_{\text{próbki}}}{A_{\text{kontroli}}} \right) \times 100$$

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu ANOVA z odpowiednią korektą post-hoc. Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartości $p < 0,05$.

6.4.5. Badanie morfologii komórek

Zmiany morfologiczne komórek były monitorowane za pomocą mikroskopu świetlnego. Zdjęcia komórek wykonano po 24 godzinach inkubacji w obecności ligandów i ich metalokompleksów w stężeniach od 12,5 μM do 200 μM . Obserwowano zmiany w kształcie komórek, adhezji do podłoża oraz ewentualne wytrącanie się nierozpuszczalnych osadów w wyniku inkubacji z metalokompleksami.

6.4.6. Ocena wpływu na cytotoksyczność leku

W badaniu dotyczącym interakcji między ligandami a doksorubicyną komórki MDA-MB-231 inkubowano przez 24 godziny w obecności doksorubicyny (0,312 μM , 0,625 μM , 2,5 μM) samodzielnie oraz w połączeniu z ligandami (kwercetyna) lub metalokompleksami (kwercetyna-Ru). Po inkubacji oceniono morfologię komórek w świetle widzialnym oraz fluorescencyjnym, wykorzystując test fluorescencji doksorubicyny.

6.4.7. Mikroskopia fluorescencyjna

Zdjęcia komórek wykonano po 24-godzinnej inkubacji, monitorując zmiany morfologiczne oraz stopień akumulacji doksorubicyny wewnątrz komórek przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Wartości fluorescencji komórek oceniano jakościowo na podstawie intensywności sygnału fluorescencyjnego.

6.5. Tworzenie kompleksów z metalami i ich analiza spektrofotometryczna

6.5.1. Przygotowanie ligandów i rozpuszczalników

Ligandy o czystości powyżej 98%, zakupione od firmy Sigma (Merck), zostały użyte do syntezy metalokompleksów. Do procesu syntezy zastosowano dimetylosulfotlenek (DMSO), etanol oraz wodorotlenek sodu (NaOH) o czystości analitycznej. Woda ultraczysta uzyskana za pomocą systemu Milli-Q została użyta do przemywania osadów, które wytrącały się w procesie syntezy na sączkach filtracyjnych. Ligandy zostały rozpuszczone w DMSO, tworząc roztwory macierzyste o stężeniu 0,1 mol/L.

Następnie, roztwory ligandów były rozcieńczane etanolem. W celu deprotonacji grup donorowych ligandów, rozcieńczone roztwory mieszano z etanolem z roztworem NaOH. W syntezie metalokompleksów użyto roztworów soli metali w formie chlorków. Stosowano metale w postaci dwuwartościowej oraz trójwartościowej, przy czym stosunek molowy ligandów do metali wynosił odpowiednio 1:2 dla metali dwuwartościowych i 1:3 dla metali trójwartościowych.

6.5.2. Synteza związków kompleksowych

Roztwory ligandów po deprotonacji łączono z roztworami soli metali w odpowiednich proporcjach, prowadząc reakcję w temperaturze pokojowej. Proces kompleksowania monitorowano wizualnie pod kątem zmian barwy roztworu, co świadczyło o tworzeniu kompleksów. Po zakończeniu reakcji kompleksy były oczyszczane poprzez sączenie i przemywanie wodą ultraczystą. Ostatecznie, uzyskane osady suszono.

6.5.3. Przygotowanie próbek do badań biologicznych

Kompleksy metaloorganiczne przeznaczone do badań biologicznych rozpuszczano w kompletnym medium hodowlanym DMEM, wzbogaconym w 10% objętościowym FBS oraz 1% antybiotyków (penicylina i streptomycyna). Otrzymane roztwory kompleksów stosowano w różnych stężeniach w testach biologicznych.

6.5.4. Badanie struktury metodami spektrofotometrycznymi

METODA UV-Vis

Spektroskopię UV-Vis zastosowano do badania procesu kompleksowania ligandów z jonami metali. Pomiarów dokonano za pomocą spektrofotometru UV-Vis w zakresie długości fal od 200 nm do 800 nm.

Roztwory kompleksów o stężeniu 1×10^{-5} M przygotowywano w wodzie, a pomiary wykonywano w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej 1 cm. Widma rejestrowano dla ligandów, soli metali oraz powstałych kompleksów, co pozwalało na identyfikację charakterystycznych zmian w maksymalnej absorpcji i przesunięć związanych z procesem kompleksowania.

METODA FT-IR

Spektroskopia FT-IR była używana do analizy struktury chemicznej powstałych kompleksów. Widma FT-IR rejestrowano w zakresie od 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1} przy użyciu spektrometru FT-IR marki Bruker.

Kompleksy przygotowywano w postaci pastylek, prasując próbki z KBr. Każda próbka była mierzona co najmniej trzykrotnie, a uzyskane widma uśredniano. Analizowano zmiany w charakterystycznych pasmach drgań grup funkcyjnych, takich jak grupy karbonylowe i aminowe, co pozwoliło na określenie miejsc koordynacji metalu oraz zrozumienie struktury powstałych kompleksów. Szczególną uwagę zwracano na przesunięcia pasm, które wskazywały na wiązanie ligandów z metalem w procesie tworzenia kompleksów.

6.5.5. Badania stechiometrii związków kompleksowych w roztworze

Metoda Joba, znana również jako metoda stosunków molowych, została zastosowana do określenia stechiometrii kompleksów metal-ligand w roztworze.

Proces ten opiera się na przygotowaniu serii mieszanin roztworów ligandu i jonu metalu o zmiennych proporcjach molowych, przy czym całkowita objętość roztworów pozostaje stała (w tym eksperymencie była to objętość 2 mL). Roztwory ligandu i jonu metalu przygotowano osobno w stężeniach o równych wartościach molowych.

Następnie, różne proporcje molowe metalu do ligandu (od 0 do 1) były osiągnięte przez mieszanie odpowiednich objętości roztworów metalu i ligandu, przy jednoczesnym utrzymaniu stałej objętości końcowej roztworu w każdej próbce (2 mL). Wartość stosunku molowego była wyznaczana według wzoru:

$$X_L = \frac{C_M}{C_M + C_L}$$

gdzie:

- C_M to stężenie jonu metalu,
- C_L to stężenie ligandu,
- X_L to molowy stosunek jonu metalu do sumy stężeń jonu metalu i ligandu.

Absorbancję każdej mieszaniny mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali, która została wcześniej ustalona eksperymentalnie jako długość odpowiadająca maksymalnej absorpcji dla kompleksu metal-ligand. Do pomiaru absorbancji wykorzystano spektrofotometr UV-Vis. Pomiary wykonywano w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 1 cm.

Uzyskane wyniki zostały przedstawione na wykresie, na którym oś X odpowiada wartości X_L , a oś Y – zmierzonej absorbancji dla każdego kompleksu. Maksymalna wartość absorbancji odpowiadała stosunkowi molowemu jonu metalu do ligandu w powstałym kompleksie. Stechiometria kompleksu metal-ligand została określona na podstawie wartości X_L , dla której uzyskano maksymalną absorbancję.

6.6. Genotoksyczność

6.6.1. Przygotowanie struktur do dokowania molekularnego

Dokowanie molekularne zostało przeprowadzone w celu oceny interakcji kaemferolu oraz jego kompleksów z miedzią i cynkiem z ludzką topoizomerazą DNA II. Wykorzystano struktury B-DNA (PDB ID: 1BDNA) dostępne w bazie danych PDB. Przygotowanie struktur do dokowania obejmowało następujące kroki:

- Struktury B-DNA oraz ligandów przygotowano przy użyciu programu Autodock Tools (ADT) w wersji 1.5.6rc2. Do struktur ligandów dodano niepolarne atomy wodoru oraz przypisano im ładunki Gasteigera.
- Struktury zapisano w formacie PDBQT, gotowym do dokowania.
- Siatkę obliczeniową do dokowania ustawiono w ADT, wyznaczając centralny punkt siatki w miejscu przecięcia DNA przez kompleksy topoizomerazy-DNA. Siatka miała wymiary $60 \times 60 \times 60 \text{ \AA}$, a odstęp między punktami siatki wynosił $0,375 \text{ \AA}$.
- Wszystkie wiązania obrotowe ligandów zostały uwzględnione w analizach, podczas gdy makrocząsteczki (DNA) były traktowane jako struktury sztywne.
- Dokowanie przeprowadzono za pomocą AutoDock w wersji 1.5.6rc2. Po zakończeniu dokowania, usunięto cząsteczki leku oraz heteroatomy, pozostawiając jedynie kompleksy ligand-receptor.
- Energia wiązania ligandów z DNA została obliczona, a uzyskane wartości porównano w celu oceny siły interakcji ligandów i ich kompleksów z jonami metali.

6.6.2. Test z wykorzystaniem modyfikowanego szczepu bakterii

W celu zbadania potencjalnej genotoksyczności ligandów i kompleksów metalicznych wykorzystano zmodyfikowane szczepy *Escherichia coli* K-12 MG1655 z plazmidową fuzją transkrypcyjną między promotorem *recA*, odpowiedzialnym za odpowiedź SOS na uszkodzenia DNA, a genem *gfp* (*gfpmut2*). Bakterie były hodowane na pożywce agarowej LB z kanamycyną (100 mg/mL) w temperaturze 30°C przez noc. Następnie kolonie były przenoszone do pożywki bulionowej LB z kanamycyną (100 mg/mL) i inkubowane przez noc w tej samej temperaturze.

Komórki odświeżano w świeżej pożywce LB z kanamycyną przez 2 godziny, a następnie płukano w buforze PBS. Początkowa gęstość optyczna komórek została ustandaryzowana do wartości OD przy długości fali 600 nm za pomocą spektrofotometru (Glomax1, Promega).

Przeprowadzono rozcieńczenia seryjne w buforze PBS, aby uzyskać zawiesinę komórek o gęstości 4×10^7 CFU/mL. Testowane związki (ligandy i kompleksy metaloorganiczne) w stężeniach 25, 50 i 100 μM dodano do zawiesin komórek bakteryjnych (4×10^7 CFU/mL). Po ekspozycji przez 24 godziny, komórki płukano w buforze PBS.

Intensywność fluorescencji GFP w objętości 1 mL zawiesiny (4×10^5 CFU/mL) mierzono spektrofлуorometrem (Glomax1, Multi Detection System, Promega) przy

długościach fali wzbudzenia 485 nm i emisji 507 nm. Wartość wskaźnika fluorescencji specyficznej (SFI) obliczono zgodnie ze wzorem:

$$SFI = \frac{IF}{OD}$$

gdzie IF to intensywność fluorescencji, a OD to gęstość optyczna przy 600 nm.

Uzyskane wartości SFI były wykorzystywane do monitorowania dynamiki ekspresji GFP po traktowaniu bakteryjnych biosensorów badanymi związkami, co pozwoliło na ocenę ich genotoksyczności.

III

Materiały opublikowane

Artykuł przeglądowy

Tytuł oryginalny:

Another look at phenolic compounds in cancer therapy: the effect of polyphenols on ubiquitin-proteasome system

Autorzy: Aleksandra Golonko, Tomasz Pienkowski, Renata Świsłocka, Ryszard Łaźny,
Marek Roszko, Włodzimierz Lewandowski

Czasopismo: European Journal of Medicinal Chemistry

Tom: 167

Rok: 2019

Strony: 291-311

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.044>

Impact factor: 6,0

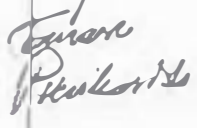
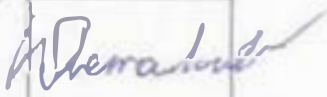
Punkty MNiSW: 140

OŚWIADCZENIE O PROCENTOWYM UDZIALE WSPÓŁAUTORÓW W OPRACOWANIU PUBLIKACJI

Poniżej przedstawiono zestawienie współautorów wraz z podaniem ich pełnej afiliacji oraz procentowym wkładem w przygotowanie publikacji.

Niniejszym oświadczamy, że publikacja o charakterze Review article pod tytułem:

Golonko, A., Pienkowski, T., Świsłocka, R., Łażny, R., Roszko, M., & Lewandowski, W.
(2019). Another look at phenolic compounds in cancer therapy: the effect of polyphenols on ubiquitin-proteasome system. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 167, 291–311, Elsevier Masson.
DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.01.044; (IF: 6, 140 pkt MNiSW)

Lp.	Autor	Afiliacja	Procentowy udział	Podpis
1.	Aleksandra Golonko	Department of Food Analysis, Institute of Agricultural and Food Biotechnology, Rakowiecka 36, 02-532, Warsaw, Poland	25%	
2.	Tomasz Pienkowski	Białystok University of Technology, Faculty of Civil Engineering and Environmental Engineering, Department of Chemistry, Biology and Biotechnology, Wiejska 45E, 15-351, Białystok, Poland	25%	
3.	Renata Świsłocka	Białystok University of Technology, Faculty of Civil Engineering and Environmental Engineering, Department of Chemistry, Biology and Biotechnology, Wiejska 45E, 15-351, Białystok, Poland	15%	
4.	Ryszard Łażny	Institut of Chemistry, University of Białystok, Ciołkowskiego 1K, 15-245, Białystok, Poland	15%	
5.	Marek Roszko	Department of Food Analysis, Institute of Agricultural and Food Biotechnology, Rakowiecka 36, 02-532, Warsaw, Poland	10%	
6.	Włodzimierz Lewandowski	Department of Food Analysis, Institute of Agricultural and Food Biotechnology, Rakowiecka 36, 02-532, Warsaw, Poland	10%	

Łączny udział: 100%

Oświadczamy, że powyższe dane są zgodne ze stanem faktycznym oraz że każdy ze współautorów spełnia kryteria autorstwa zgodnie z powszechnie przyjętymi zasadami etyki publikacyjnej.

Artykuł „*Another look at phenolic compounds in cancer therapy: the effect of polyphenols on ubiquitin-proteasome system*” (Golonko et al., 2019) przedstawia przegląd badań dotyczących wpływu polifenoli na układ ubikwityna-proteasom (UPS), który jest kluczowym mechanizmem regulującym degradację białek w komórkach eukariotycznych. W artykule poruszono dwa główne zagadnienia: jak flawonoidy, będące polifenolami, mogą modulować aktywność UPS oraz jakie są ich potencjalne synergistyczne lub antagonistyczne efekty w terapii i profilaktyce przeciwnowotworowej.

Badania nad polifenolami, takimi jak resweratrol, apigenina, kwercetyna i kaempferol, wykazują, że związki te mogą działać jako inhibitory UPS, co prowadzi do akumulacji białek proapoptotycznych, takich jak p53, i aktywacji kaspaz, co sprzyja indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych. Artykuł podkreśla, że flawonoidy mogą zarówno bezpośrednio wiązać się z proteasomami, jak i pośrednio wpływać na szlaki sygnalizacyjne z nimi związane.

W kontekście celu niniejszej pracy badawczej, artykuł ten bezpośrednio odnosi się do badania związku między strukturą chemiczną flawonoidów a ich aktywnością biologiczną. Opisano, w jaki sposób struktura flawonoidów wpływa na ich zdolność do oddziaływania z białkami UPS i możliwość ich zastosowania w żywieniu funkcjonalnym i terapii onkologicznej.

W szczególności, badania nad oddziaływaniem flawonoidów z proteasomami wskazują na możliwość tworzenia kompleksów z metalami, co może modyfikować ich biodostępność i zwiększać aktywność biologiczną. Przykłady interakcji między polifenolami a konwencjonalnymi inhibitorami proteasomów, takimi jak bortezomib, sugerują, że tworzenie kompleksów flawonoidów z metalami mogłoby poprawić ich działanie biologiczne. Nowym elementem publikacji w tej tematyce było dokładne przanalizowanie miejsc i siły wiązania opisanych flawonoidów w strukturze białek z wykorzystaniem dostępnych danych modelowych i eksperymentalnych.

Wnioski z artykułu mają istotne znaczenie dla oceny potencjału flawonoidów jako składników żywności funkcjonalnej, szczególnie w kontekście wspomagania terapii onkologicznej. Zastosowanie tych związków w dietoterapii może odgrywać ważną rolę w profilaktyce nowotworowej, jednak, jak podkreślają autorzy, flawonoidy w diecie nie mogą być traktowane jako samodzielne środki terapeutyczne, a jedynie jako element wspierający terapię.

Artykuł ten był cytowany ponad 20 razy, m.in. w pracach z zakresu rozwoju naturalnych produktów jako inhibitorów proteasomu w terapii przeciwnowotworowej, badań nad polifenolami i ich wpływem na ścieżki sygnałowe w komórkach nowotworowych, jak również w analizach metabolitów roślinnych oraz ich potencjału terapeutycznego. Cytowania dotyczą także badań nad wpływem naturalnych związków bioaktywnych na stres oksydacyjny i procesy zapalne, a także nad ich wykorzystaniem w opracowywaniu nowych leków przeciwnowotworowych.

Udział w przygotowaniu publikacji:

- I. Przygotowanie i rozwinięcie koncepcji artykułu, w tym wprowadzenie dotyczące układu proteasomowego (UPS) oraz jego roli w degradacji białek w komórkach nowotworowych. Uwzględnienie mechanizmu działania proteasomów, ich wpływu na homeostazę komórkową oraz na różne procesy nowotworzenia, w tym angiogenezę, proliferację i apoptozę komórek nowotworowych.
- II. Graficzne przedstawienie oraz analiza mechanizmu działania polifenoli (jak resweratrol, kwercetyna, katechiny) na układ proteasomowy, uwzględniając wpływ tych związków na aktywność proteasomów w komórkach nowotworowych. Uwzględnienie zależności między strukturą chemiczną polifenoli a ich zdolnością do inhibicji proteasomów.
- III. Opracowanie rysunków oraz schematów, które ilustrują mechanizm inhibicji proteasomów przez polifenole, w tym procesy ubikwitynacji i rozkładu białek. Szczegółowa analiza mechanizmów, jak np. interakcja EGCG z podjednostkami proteasomów, oraz wpływ tej inhibicji na ścieżki sygnalizacyjne prowadzące do apoptozy komórek nowotworowych.
- IV. Opis mechanizmu tworzenia związków kompleksowych między jonami metali a związkami fenolowymi, w kontekście wpływu na aktywność proteasomów. Uwzględnienie wpływu obecności metali w kompleksach z polifenolami na modyfikację aktywności proteasomu i ich potencjalne działanie cytoprotekcyjne.

Artykuł przeglądowy

Tytuł oryginalny:

Curcumin as tyrosine kinase inhibitor in cancer treatment

Autorzy: Aleksandra Golonko, Hanna Lewandowska, Renata Świsłocka, Urszula
Teresa Jasińska, Waldemar Priebe, Włodzimierz Lewandowski

Czasopismo: European Journal of Medicinal Chemistry

Tom: 181

Rok: 2019

Numer artykułu: 111512

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111512>

Impact factor: 6,0

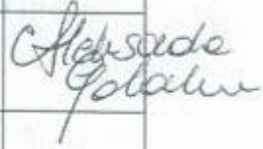
Punkty MNiSW: 140

OŚWIADCZENIE O PROCENTOWYM UDZIALE WSPÓLAUTORÓW W OPRACOWANIU PUBLIKACJI

Poniżej przedstawiono zestawienie współautorów wraz z podaniem ich pełnej afiliacji oraz procentowym wkładem w przygotowanie publikacji.

Niniejszym oświadczamy, że publikacja o charakterze **Review article** pod tytułem:

Golonko, A., Lewandowska, H., Świsłocka, R., Jasińska, U.T., Priebe, W., & Lewandowski, W. (2019). Curcumin as tyrosine kinase inhibitor in cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 181, 111512. Elsevier Masson. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.07.015; (IF: 6, 140 pkt MNiSW)

Lp.	Autor	Afiliacja	Procentowy udział	Podpis
1.	A. Golonko	Institute of Agricultural and Food Biotechnology, Rakowiecka 36, 02-532, Warsaw, Poland	30%	
2.	H. Lewandowska	Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Centre for Radiobiology and Biological Dosimetry, Dorodna 16, 03-195, Warsaw, Poland	25%	
3.	R. Świsłocka	Białystok University of Technology, Faculty of Civil Engineering and Environmental Engineering, Department of Chemistry, Biology and Biotechnology, Wiejska 45E, 15-351, Białystok, Poland	20%	
4.	U.T. Jasińska	Institute of Agricultural and Food Biotechnology, Rakowiecka 36, 02-532, Warsaw, Poland	10%	
5.	W. Priebe	Department of Experimental Therapeutics, University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA	10%	
6.	W. Lewandowski	Institute of Agricultural and Food Biotechnology, Rakowiecka 36, 02-532, Warsaw, Poland	5%	

Łączny udział: 100%

Oświadczamy, że powyższe dane są zgodne ze stanem faktycznym oraz że każdy ze współautorów spełnia kryteria autorstwa zgodnie z powszechnie przyjętymi zasadami etyki publikacyjnej.

Artykuł „*Curcumin as tyrosine kinase inhibitor in cancer treatment*” (Golonko et al., 2019) opisuje kurkumę jako składnik żywności funkcjonalnej, szczególnie w kontekście chemoprewencji nowotworów. Kurkumina, główny bioaktywny składnik kurkumy, jest szeroko badana ze względu na swoje właściwości przeciwnowotworowe, które mogą wynikać z jej działania jako inhibitora kinaz tyrozynowych oraz modulatora szlaków sygnalizacyjnych związanych z procesami nowotworowymi.

W artykule omówiono szereg badań dotyczących wpływu kurkuminy na różne receptory RTK, w tym EGFR (receptor naskórkowego czynnika wzrostu), IGF-1R (receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu), VEGFR (receptor naczyniowego czynnika wzrostu śródbłónka) oraz c-Met (receptor hepatocytowego czynnika wzrostu). Wyniki badań wykazują, że kurkumina może hamować autofosforylację tych receptorów, co prowadzi do zahamowania sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, redukcji proliferacji komórek nowotworowych oraz ograniczenia angiogenezy, co spowalnia rozwój guza.

Szczególną uwagę poświęcono mechanizmom molekularnym interakcji kurkuminy z RTK, w tym wpływowi na szlaki sygnalizacyjne, takie jak PI3K/AKT, MAPK/ERK oraz NF-κB. Artykuł zwraca uwagę na zdolność kurkuminy do modulacji tych szlaków, co może przyczyniać się do zwiększenia wrażliwości komórek nowotworowych na terapię przeciwnowotworową, w tym chemioterapię. W kontekście zastosowania kurkuminy w terapii nowotworowej, podkreślono jej potencjał jako środka wspomagającego (adiuwant) w leczeniu, ze względu na minimalną toksyczność wobec zdrowych komórek. Artykuł jednak zwraca uwagę na ograniczenia związane z biodostępnością kurkuminy oraz jej szybkim metabolizmem w organizmie. W związku z tym zaproponowano różne strategie mające na celu poprawę jej efektywności, takie jak tworzenie kompleksów z metalami czy formułowanie nanozwiązków. Wysokie spożycie kurkumy, szczególnie w kuchni azjatyckiej, może wyjaśniać niższą zapadalność na niektóre typy nowotworów w tych populacjach. Badania epidemiologiczne, przeprowadzone głównie w Indiach, gdzie kurkuma jest spożywana regularnie, sugerują, że dieta bogata w ten związek może działać chemoprewencyjnie. Efekt ten może wynikać z działania kurkuminy na różne mechanizmy komórkowe, w tym, modulację odpowiedzi immunologicznej oraz redukcję stanów zapalnych, które są związane z rozwojem nowotworów.

Autorzy podkreślają jednak, że choć kurkumina wykazuje obiecujące działanie, jej niska biodostępność stanowi wyzwanie w kontekście terapeutycznym. W artykule sugeruje się, że modyfikacje chemiczne kurkuminy lub jej podawanie w postaci nanocząsteczek mogą zwiększyć jej skuteczność, co czyni ją bardziej atrakcyjnym składnikiem w zastosowaniach prewencyjnych i terapeutycznych.

Artykuł ten cytowany był 79 razy m.in. w pracach opisujących właściwości bioaktywne roślinnych metabolitów wtórnych oraz ich potencjał w zwiększaniu skuteczności leków przeciwnowotworowych, zwłaszcza w kontekście roślin o wysokiej zawartości polifenoli, takich jak zielona herbata, kurkuma czy rodzaju ginseng.

Udział w przygotowaniu publikacji:

- I. Opracowano dane literaturowe przedstawiające problematykę epidemiologiczną, wskazując na badania dotyczące wysokiego spożycia kurkuminy i jej potencjalnych korzyści zdrowotnych, szczególnie w kontekście prewencji nowotworów w populacjach azjatyckich.
- II. Przygotowano graficzne opracowanie wykresów i diagramów dotyczących działania kurkuminy na kinazy tyrozynowe receptorowe i niereceptorowe, przedstawiających kluczowe szlaki sygnalizacyjne związane z jej aktywnością w komórkach nowotworowych.
- III. Opracowano rozdział dotyczący problematyki biodostępności kurkuminy, uwzględniając szczegóły jej niskiej przyswajalności oraz proponowane rozwiązania zwiększające jej efektywność, takie jak nanocząstki i pochodne chemiczne.
- IV. Przeprowadzono przegląd i opis mechanizmów aktywności kurkuminy na kinazy tyrozynowe, z uwzględnieniem zarówno receptorowych, jak i niereceptorowych, co miało kluczowe znaczenie w kontekście wyjaśnienia potencjalnego działania przeciwnowotworowego tej substancji.

Artykuł przeglądowy

Tytuł oryginalny:

Why Do Dietary Flavonoids Have a Promising Effect as Enhancers of Anthracyclines? Hydroxyl Substituents, Bioavailability and Biological Activity

Autorzy: Aleksandra Golonko, Adam Jan Olichwier, Renata Świśłocka, Łukasz
Szczerbiński, Włodzimierz Lewandowski

Czasopismo: International Journal of Molecular Sciences

Tom: 24(1)

Rok: 2022

Numer artykułu: 391

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24010391>

Impact factor: 4,9

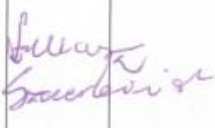
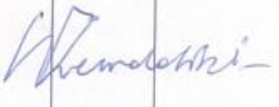
Punkty MNiSW: 140

OŚWIADCZENIE O PROCENTOWYM UDZIALE WSPÓŁAUTORÓW W OPRACOWANIU PUBLIKACJI

Poniżej przedstawiono zestawienie współautorów wraz z podaniem ich pełnej afiliacji oraz procentowym wkładem w przygotowanie publikacji.

Niniejszym oświadczamy, że publikacja o charakterze **Review article** pod tytułem:

Golonko, A., Olichwier, A.J., Świsłocka, R., Szczerbiński, Ł., & Lewandowski, W.
(2022). Why do dietary flavonoids have a promising effect as enhancers of
anthracyclines? Hydroxyl substituents, bioavailability and biological activity.
International Journal of Molecular Sciences, 24(1), 391. MDPI.
doi.org/10.3390/ijms24010391; (IF: 4.9, 140 pkt MNiSW)

Lp.	Autor	Afiliacja	Procentowy udział	Podpis
1.	Aleksandra Golonko	Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland; Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology-State Research Institute, 02-532 Warsaw, Poland	30%	
2.	Adam Jan Olichwier	Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland	20%	
3.	Renata Świsłocka	Department of Chemistry, Biology and Biotechnology, Białystok University of Technology, 15-351 Białystok, Poland	20%	
4.	Łukasz Szczerbiński	Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland; Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland	15%	
5.	Włodzimierz Lewandowski	Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology-State Research Institute, 02-532 Warsaw, Poland; Department of Chemistry, Biology and Biotechnology, Białystok University of Technology, 15-351 Białystok, Poland	15%	

Łączny udział: 100%

Oświadczamy, że powyższe dane są zgodne ze stanem faktycznym oraz że każdy ze współautorów spełnia kryteria autorstwa zgodnie z powszechnie przyjętymi zasadami etyki publikacyjnej.

Artykuł omawia działanie flawonoidów, które potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie w terapii z wykorzystaniem antracyklin, takich jak doksorubicyna, które są skutecznymi lekami przeciwnowotworowymi. Ich stosowanie jest ograniczone ze względu na toksyczność, w tym kardiotoxyczność oraz możliwość wywoływania oporności komórek nowotworowych na leczenie. W publikacji wykazano, że flawonoidy, dzięki swoim właściwościom antyoksydacyjnym oraz zdolnościom do modulowania kluczowych szlaków sygnalizacyjnych, mogą wspierać terapię poprzez zmniejszenie toksyczności i zwiększenie efektywności terapeutycznej leku. Antracykliny, będące modelową grupą leków przeciwnowotworowych, charakteryzują łatwym przenikaniem do wnętrza komórek nowotworowych, gdzie wiążą się z DNA, destabilizując jego strukturę, co skutkuje apoptozą komórek nowotworowych. Jednak równocześnie generują reaktywne formy tlenu (ROS), które mogą prowadzić do uszkodzeń zdrowych komórek, szczególnie w sercu, co powoduje kardiotoxyczność. Flawonoidy, jako naturalne antyoksydanty, mogą redukować ten efekt, neutralizując wolne rodniki i chroniąc komórki przed stresem oksydacyjnym.

Ponadto flawonoidy, takie jak kwercetyna, apigenina czy kaempferol wpływają na białka transportowe, takie jak P-gp i BCRP, które są zaangażowane w transport leków, co może prowadzić do lepszego przenikania antracyklin do komórek nowotworowych. W artykule szczegółowo omówiono także mechanizmy interakcji flawonoidów z cytochromem P450, który odpowiada za metabolizm antracyklin. Inhibicja tego szlaku może przyczyniać się do zwiększenia biodostępności leków, co z kolei przekłada się na lepsze wyniki terapeutyczne.

Ważnym elementem analizy jest struktura flawonoidów, a dokładniej liczba i pozycja grup hydroksylowych w ich strukturze, które mają kluczowe znaczenie dla ich aktywności biologicznej, w tym zdolności antyoksydacyjnych i biodostępności. W artykule pokazano, że flawonoidy, dzięki obecności licznych grup hydroksylowych, wykazują lepsze właściwości ochronne przed stresem oksydacyjnym oraz większą zdolność do interakcji z receptorami komórkowymi, co czyni je obiecującymi kandydatami do żywienia wspomagającego. Flawonoidy naturalne związki o silnych właściwościach biologicznych, mogą pełnić podwójną rolę – zarówno w terapii przeciwnowotworowej, jak i w prewencji chorób cywilizacyjnych, kiedy są obecne w diecie w ramach żywności funkcjonalnej.

Artykuł bezpośrednio odnosi się do głównych założeń pracy doktorskiej, wykazując, jak flawonoidy mogą być zintegrowane w dietoterapii jako składniki wspierające terapię przeciwnowotworową. Dalsze badania nad wykorzystaniem flawonoidów w żywieniu funkcjonalnym, zwłaszcza w kontekście interakcji z lekami, otwierają nowe możliwości w zakresie poprawy jakości życia pacjentów onkologicznych oraz zmniejszenia skutków ubocznych terapii.

Artykuł cytowany był 9 razy m.in. w pracach obejmujących badania flawonoidów, które wykazują szerokie spektrum właściwości biologicznych, takich jak działanie przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, oraz modulowanie ścieżek sygnalizacyjnych w komórkach nowotworowych.

Udział w przygotowaniu publikacji:

- I. Przygotowanie opracowania graficznego, obejmującego wykresy i schematy ilustrujące wpływ grup hydroksylowych na biodostępność flawonoidów oraz ich działanie przeciwnowotworowe w synergii z antracyklinami.
- II. Przeprowadzenie przeglądu literatury dotyczącej flawonoidów, ich właściwości antyoksydacyjnych oraz modulacji aktywności białek transportowych i enzymów detoksykacyjnych.
- III. Zestawienie danych literaturowych w formie tabelarycznej, które ukazuje relacje między liczbą grup hydroksylowych a aktywnością biologiczną flawonoidów w kontekście terapii antracyklinami.
- IV. Wykorzystanie modelowania biodostępności w celu opisu zależności między strukturą flawonoidów, ich zdolnością do neutralizowania wolnych rodników oraz przenikalnością przez błony komórkowe.
- V. Opracowanie analizy mechanizmów działania flawonoidów na poziomie molekularnym, w tym ich interakcji z enzymami cytochromu P450 oraz białkami transportowymi, które wpływają na biodostępność i efektywność terapeutyczną antracyklin.

Artykuł przeglądowy

Tytuł oryginalny:

Dietary factors and their influence on immunotherapy strategies in oncology: a comprehensive review

Autorzy: Aleksandra Golonko, Tomasz Pienkowski, Renata Świsłocka, Sylwia Orzechowska, Katarzyna Marszałek, Łukasz Szczerbiński, Andrzej H. Świergiel, Włodzimierz Lewandowski

Czasopismo: Cell Death & Disease

Tom: 15(4)

Rok: 2024

Numer artykułu: 254

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-024-011254>

Impact factor: 8,1

Punkty MNiSW: 140

OŚWIADCZENIE O PROCENTOWYM UDZIALE WSPÓLAUTORÓW W OPRACOWANIU PUBLIKACJI

Poniżej przedstawiono zestawienie współautorów wraz z podaniem ich pełnej afiliacji oraz procentowym wkładem w przygotowanie publikacji.

Niniejszym oświadczamy, że publikacja o charakterze **Review article** pod tytułem:

Golonko, A., Pienkowski, T., Świsłocka, R., Orzechowska, S., Marszałek, K., Szczerbiński, L., Świergiel, A.H., & Lewandowski, W. (2024). Dietary factors and their influence on immunotherapy strategies in oncology: A comprehensive review. *Cell Death & Disease*, 15(4), 254. Nature Publishing Group UK London. doi: 10.1038/s41419-024-06641-6. (IF: 8.1, 140 pkt MNiSW)

Lp.	Autor	Afiliacja	Procentowy udział	Podpis
1.	Aleksandra Golonko (#)	Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology State Research Institute, Rakowiecka 36, 02-532 Warsaw, Poland; Clinical Research Center, Medical University of Białystok, M. Skłodowskiej-Curie 24a, 15-276 Białystok, Poland	20%	Aleksandra Golonko
2.	Tomasz Pienkowski (#)	Clinical Research Center, Medical University of Białystok, M. Skłodowskiej-Curie 24a, 15-276 Białystok, Poland	20%	Tomasz Pienkowski
3.	Renata Świsłocka	Department of Chemistry, Biology and Biotechnology, Białystok University of Technology, Wiejska 45 E, 15-351 Białystok, Poland	15%	Renata Świsłocka
4.	Sylwia Orzechowska	Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Gronostajowa 2, 30-387 Krakow, Poland	10%	Sylwia Orzechowska
5.	Krzysztof Marszałek	Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology State Research Institute, Rakowiecka 36, 02-532 Warsaw, Poland	10%	K. Marszałek
6.	Lukasz Szczerbiński	Clinical Research Center, Medical University of Białystok, M. Skłodowskiej-Curie 24a, 15-276 Białystok, Poland	10%	Lukasz Szczerbiński
7.	Artur Hugo Świergiel	Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology State Research Institute, Rakowiecka 36, 02-532 Warsaw, Poland; Faculty of Biology, Department of Animal and Human Physiology, University of Gdańsk, W. Stwosza 59, 80-308 Gdańsk, Poland	10%	Artur Hugo Świergiel
8.	Włodzimierz Lewandowski	Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology State Research Institute, Rakowiecka 36, 02-532 Warsaw, Poland; Department of Chemistry, Biology and Biotechnology, Białystok University of Technology, Wiejska 45 E, 15-351 Białystok, Poland	5%	Włodzimierz Lewandowski

Łączny udział: 100%

Oświadczamy, że powyższe dane są zgodne ze stanem faktycznym oraz że każdy ze współautorów spełnia kryteria autorstwa zgodnie z powszechnie przyjętymi zasadami etyki publikacyjnej.

Artykuł *Dietary factors and their influence on immunotherapy strategies in oncology: a comprehensive review* przedstawia kompleksową analizę czynników dietetycznych, zwłaszcza flawonoidów, i ich wpływu na strategie immunoterapii w leczeniu nowotworów. Flawonoidy, będące polifenolami roślinnymi o szerokim spektrum działania biologicznego, odgrywają istotną rolę w modulacji odpowiedzi immunologicznej, w tym w interakcjach z receptorami immunologicznymi oraz szlakami sygnalizacyjnymi istotnymi w onkologii.

W szczególności, praca skupia się na działaniu flawonoidów takich jak apigenina, luteolina, galusan epigallokatechiny (EGCG), hesperydyna oraz resweratrol. Związki te wykazują zdolność do regulacji kluczowych szlaków molekularnych, takich jak NF- κ B i PI3K/Akt, co prowadzi do zmniejszenia stanu zapalnego oraz zwiększenia aktywności przeciwnowotworowej. Istotnym elementem publikacji jest również analiza wpływu flawonoidów na mikrobiom jelitowy, który odgrywa pośrednią rolę w kształtowaniu odpowiedzi immunologicznej, modulując produkcję metabolitów immunomodulujących oraz wpływając na integralność bariery jelitowej. Zmniejszona przepuszczalność jelitowa oraz ograniczona translokacja patogenów i endotoksyn do krążenia ogólnoustrojowego redukują poziom ogólnoustrojowego stanu zapalnego, co jest kluczowe w prewencji nowotworów oraz wsparciu immunoterapii.

Artykuł szeroko omawia, w jaki sposób flawonoidy wpływają na skuteczność inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych (ICI), takich jak inhibitory PD-1 i PD-L. Badania przedstawione w pracy wykazują, że flawonoidy mogą wpływać na ekspresję PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych, zwiększając tym samym skuteczność odpowiedzi immunologicznej w eliminacji komórek rakowych. Przykłady flawonoidów, takich jak apigenina i luteolina, pokazują ich zdolność do hamowania ekspresji PD-L1 w różnych typach nowotworów, w tym w czerniaku oraz raku piersi, co otwiera nowe możliwości terapeutyczne.

Publikacja integruje wiedzę na temat synergistycznego działania flawonoidów z nowoczesnymi strategiami leczenia onkologicznego, koncentrując się na ich wpływie na odpowiedź immunologiczną oraz możliwości zmniejszenia skutków ubocznych związanych z immunoterapią. W pracy omówiono także potencjalne wykorzystanie flawonoidów jako składników żywności funkcjonalnej wspierających leczenie nowotworów, podkreślając ich rolę w modulacji procesów zapalnych oraz antyoksydacyjnych.

Publikacja ta była cytowana 6 razy, a dodatkowo została wyróżniona jako "Wybór redakcji – Artykuł miesiąca" przez czasopismo, w którym została opublikowana. Ponadto była ona udostępniana przez niezależnych twórców na portalach społecznościowych i branżowych, otwierając dyskusje w zakresie tego tematu.

Udział w publikacji:

- I. Opracowanie rozdziału na temat wpływu flawonoidów na skuteczność stosowania inhibitorów punktów kontrolnych immunologicznych (PD-1/PD-L1), w tym szczegółowy opis mechanizmów modulacji ekspresji PD-L1 przez flawonoidy.
- II. Opracowanie graficzne publikacji.
- III. Przegląd literatury na temat interakcji flawonoidów z układem immunologicznym, w tym wpływu na aktywację szlaków sygnałowych NF- κ B oraz PI3K/Akt w kontekście skuteczności terapii nowotworowych.

Artykuł badawczy

Tytuł oryginalny:

Apigenin's Modulation of Doxorubicin Efficacy in Breast Cancer

Autorzy: Aleksandra Golonko, Adam Jan Olichwier, Agnieszka Szklaruk, Agnieszka Paszko, Renata Świsłocka, Łukasz Szczurbiński, Włodzimierz Lewandowski

Czasopismo: Molecules

Tom: 29(11)

Rok: 2024

Numer artykułu: 2603

DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules29112603>

Impact factor: 4,2

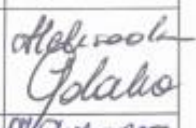
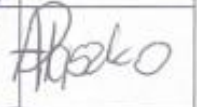
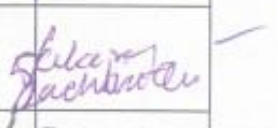
Punkty MNiSW: 140

OŚWIADCZENIE O PROCENTOWYM UDZIALE WSPÓLAUTORÓW W OPRACOWANIU PUBLIKACJI

Poniżej przedstawiono zestawienie współautorów wraz z podaniem ich pełnej afiliacji oraz procentowym wkładem w przygotowanie publikacji.

Niniejszym oświadczamy, że publikacja o charakterze **Research article** pod tytułem:

Golonko, A., Olichwier, A. J., Szklaruk, A., Paszko, A., Świsłocka, R., Szczerbiński, L., & Lewandowski, W. (2024). Apigenin's modulation of doxorubicin efficacy in breast cancer. *Molecules*, 29(11), 2603. doi:10.3390/molecules29112603 (IF: 4,2, 140 pkt MNiSW)

Lp.	Autor	Afiliacja	Procentowy udział	Podpis
1.	Aleksandra Golonko	Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, 15-089 Białystok, Poland	25%	
2.	Adam Jan Olichwier	Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, 15-089 Białystok, Poland	20%	
3.	Agata Szklaruk	Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, 15-089 Białystok, Poland	15%	
4.	Adam Paszko	Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, 15-089 Białystok, Poland	10%	
5.	Renata Świsłocka	Department of Chemistry, Biology and Biotechnology, Białystok University of Technology, 15-351 Białystok, Poland	10%	
6.	Łukasz Szczerbiński	Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, 15-089 Białystok, Poland	10%	
7.	Włodzimierz Lewandowski	Department of Chemistry, Biology and Biotechnology, Białystok University of Technology, 15-351 Białystok, Poland	10%	

Łączny udział: 100%

Oświadczamy, że powyższe dane są zgodne ze stanem faktycznym oraz że każdy ze współautorów spełnia kryteria autorstwa zgodnie z powszechnie przyjętymi zasadami etyki publikacyjnej.

Artykuł "*Apigenin's Modulation of Doxorubicin Efficacy in Breast Cancer*" opisuje wpływ apigeniny, flawonoidu o szerokim spektrum aktywności biologicznej, na cytotoksyczność doksorubicyny w leczeniu raka piersi. Badanie przeprowadzono na dwóch liniach komórek raka piersi, estrogenozależnych MCF-7 oraz niezależnych MDA-MB-231. Eksperymenty wykazały, że apigenina w połączeniu z doksorubicyną znacząco zwiększała efekt cytotoksyczny wobec komórek rakowych. Apigenina miała wpływ na różne procesy komórkowe, w tym apoptozę, proliferację i migrację komórek, co przyczyniło się do synergistycznych efektów w badanym modelu.

Dodatkowo, badanie wykazało, że apigenina moduluje akumulację kropli lipidowych w komórkach nowotworowych MDA-MB-231, co nie występowało w komórkach MCF-7, sugerując specyficzne mechanizmy zależne od typu komórek. Wyniki badania mają istotne znaczenie w kontekście rozwijania terapii wspomagających z wykorzystaniem flawonoidów, które mogą zwiększać efektywność tradycyjnych leków chemioterapeutycznych i redukować ich toksyczność.

Badania nad apigeniną dostarczają cennych informacji dotyczących wykorzystania tego naturalnego związku w strategiach leczenia, ale również skutecznej profilaktyki raka piersi, co może prowadzić do rozwoju bardziej precyzyjnych i mniej toksycznych metod terapii.

Udział w publikacji:

- I. Opracowanie rozdziału na temat wpływu apigeniny na skuteczność stosowania doksorubicyny w leczeniu raka piersi, w tym analiza mechanizmów molekularnych.
- II. Przegląd literatury dotyczącej synergistycznych efektów flawonoidów i leków chemioterapeutycznych.
- III. Wykonanie i analiza eksperymentów hodowli komórkowych, w tym badania nad żywotnością komórek i migracją.
- IV. Zestawienie danych tabelarycznych i opracowanie wykresów dotyczących cytotoksyczności apigeniny w połączeniu z doksorubicyną.
- V. Przygotowanie statystyczne wyników oraz przygotowanie manuskryptu do publikacji.

Artykuł badawczy

Tytuł oryginalny:

Biomaterials in Cancer Therapy: Investigating the Interaction between Kaempferol and Zinc Ions through Computational, Spectroscopic and Biological Analyses

Autorzy: Aleksandra Golonko, Adam Jan Olichwier, Agnieszka Paszko, Renata Świsłocka, Łukasz Szczurbiński, Włodzimierz Lewandowski

Czasopismo: Materials

Tom: 17(11)

Rok: 2024

Numer artykułu: 2526

DOI: <https://doi.org/10.3390/ma17112526>

Impact factor: 3,1

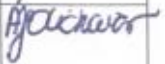
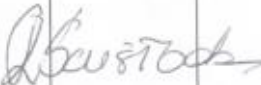
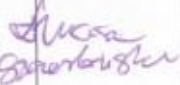
Punkty MNiSW: 140

OŚWIADCZENIE O PROCENTOWYM UDZIALE WSPÓLAUTORÓW W OPRACOWANIU PUBLIKACJI

Poniżej przedstawiono zestawienie współautorów wraz z podaniem ich pełnej afiliacji oraz procentowym wkładem w przygotowanie publikacji.

Niniejszym oświadczamy, że publikacja o charakterze **Research article** pod tytułem:

Golonko, A., Olichwier, A. J., Paszko, A., Świsłocka, R., Szczerbiński, L., & Lewandowski, W. (2024). Biomaterials in cancer therapy: Investigating the interaction between kaempferol and zinc ions through computational, spectroscopic and biological analyses. *Materials*, 17(11), 2526. doi:10.3390/ma17112526 (IF: 3,1, 140 pkt MNiSW)

Lp.	Autor	Afiliacja	Procentowy udział	Podpis
1.	Aleksandra Golonko	Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology-State Research Institute, 02-532 Warsaw, Poland; Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland	25%	
2.	Adam Jan Olichwier	Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland	20%	
3.	Adam Paszko	Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland	15%	
4.	Renata Świsłocka	Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology-State Research Institute, 02-532 Warsaw, Poland; Department of Chemistry, Biology and Biotechnology, Białystok University of Technology, 15-351 Białystok, Poland	15%	
5.	Łukasz Szczerbiński	Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland; Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland	15%	
6.	Włodzimierz Lewandowski	Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology-State Research Institute, 02-532 Warsaw, Poland; Department of Chemistry, Biology and Biotechnology, Białystok University of Technology, 15-351 Białystok, Poland	10%	

Łączny udział: **100%**

Oświadczamy, że powyższe dane są zgodne ze stanem faktycznym oraz że każdy ze współautorów spełnia kryteria autorstwa zgodnie z powszechnie przyjętymi zasadami etyki publikacyjnej.

Artykuł przedstawia analizę tworzenia kompleksu między naturalnym flawonoidem kaempferolem, występującym w żywności, a jonami cynku (Zn^{2+}), w kontekście jego potencjalnego wpływu na właściwości bioaktywne i toksyczność. Celem badań było zbadanie zmian w strukturze elektronowej kaempferolu po utworzeniu kompleksu z cynkiem oraz ocena, jak te modyfikacje wpływają na jego właściwości antyoksydacyjne i potencjalną toksyczność w komórkach. W szczególności analizowano, czy obecność jonu metalu może nasilać bądź osłabiać aktywność biologiczną związku, co ma znaczenie w kontekście bezpieczeństwa spożycia żywności zawierającej flawonoidy i wrzechobecne jony metali. Badania obejmowały zaawansowane techniki spektroskopowe (FT-IR, UV-Vis) oraz modelowanie teoretyczne, co pozwoliło na szczegółową charakterystykę interakcji metal-ligand i ocenę ich wpływu na toksyczność kaempferolu. Kaempferol, flawonoid występujący w produktach roślinnych, znany jest ze swoich właściwości przeciwzapalnych, antyoksydacyjnych oraz przeciwnowotworowych. Ze względu na niską rozpuszczalność w wodzie, jego zastosowania terapeutyczne są ograniczone, dlatego badania koncentrują się na modyfikacji struktury kaempferolu, w tym tworzeniu kompleksów z jonami metali, aby zwiększyć jego biodostępność i aktywność biologiczną. W artykule analizowano kompleks Kam-Zn, który wykazywał silniejsze działanie cytotoksyczne wobec komórek MCF-7 w porównaniu z samym kaempferolem.

Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR) i spektroskopia UV-Vis wykazały, że cynk wiąże się przez grupę hydroksylową 3-OH i grupą karbonylową 4C=O kaempferolu, co prowadzi do znaczących zmian w strukturze elektronowej i potencjalnie zwiększa właściwości antyproliferacyjne kompleksu. W badaniach biologicznych przeprowadzonych na komórkach raka piersi MCF-7 kompleks Kam-Zn wykazywał znaczną aktywność antyproliferacyjną, redukując żywotność komórek i powodując ich zmiany morfologiczne. Pomimo zmniejszenia aktywności antyoksydacyjnej po kompleksacji z cynkiem, kompleks wykazał silniejsze działanie cytotoksyczne.

Analizy teoretyczne, oparte na obliczeniach metodą DFT (B3LYP/6-311++G(d,p)), wykazały zmniejszenie przerwy energetycznej HOMO–LUMO w kompleksie Kam-Zn, co sugeruje zwiększoną reaktywność kompleksu w porównaniu z samym kaempferolem.

Badania metodą Jobsa wykazały, że stosunek molowy cynku do kaempferolu w kompleksie wynosi 1:1. Na tej podstawie zaproponowano prawdopodobną konfigurację przestrzenną tego związku, zoptymalizowano ją i określono podstawowe parametry fizykochemiczne.

Uzyskane wyniki wskazują, że kompleksowanie flawonoidów z metalami, może stanowić istotny element w badaniach nad żywnością funkcjonalną i nutraceutykami. Tego typu kompleksy mogą oferować nie tylko potencjalne korzyści zdrowotne. Obecność metali w żywności, szczególnie w postaci związków z flawonoidami, otwiera nowe możliwości rozwoju żywności wzbogaconej o bioaktywne składniki, które mogą wspierać terapię przeciwnowotworową przy jednoczesnym zminimalizowaniu negatywnych skutków ubocznych.

Udział w publikacji:

- I. Wykonano badania spektroskopowe w cieple stałym i roztworze (FT-IR, UV-Vis) w celu określenia miejsc koordynacji jonu cynku z grupami funkcyjnymi kaempferolu.
- II. Przeprowadzono modelowanie teoretyczne, analizę elektronowej struktury HOMO–LUMO oraz właściwości reaktywności kaempferolu po kompleksacji z jonami cynku.
- III. Opracowano i zsyntetyzowano kompleks Kam-Zn, przeprowadzono analizę danych, w tym statystyczną, oraz przygotowano graficzne przedstawienie wyników badań.
- IV. Dodatkowo wykonano analizę metodą NMR (materiały nieopublikowane, dostarczone do recenzji), która dostarczyła dodatkowych informacji dotyczących struktury metalokompleksów w cieple stałym.

IV

Materiały nieopublikowane

7. Wyniki

7.1. Obliczenia kwantowo-mechaniczne

7.1.1. Energia HOMO-LUMO i przerwa energetyczna (eGAP)

Resweratrol, kaempferol, i kwercetyna wykazały zbliżone wartości HOMO i LUMO, co sugeruje podobny profil reaktywności chemicznej. Resweratrol wykazał niższą elektrofilowość w porównaniu do chryzyny, co może być związane z brakiem grupy hydroksylowej w pozycji 5. Z kolei chryzyna, z wyższą energią HOMO i LUMO, wykazała większą elektrofilowość, co jest prawdopodobnie spowodowane obecnością dodatkowych grup hydroksylowych.

Apigenina, której wartości HOMO i LUMO są pośrednie między resweratrolem a chryzyną, wykazuje umiarkowaną elektrofilowość, co może być związane z obecnością grupy ketonowej w pozycji 4.

Kaempferol i kwercetyna, posiadające odpowiednio trzy i cztery grupy hydroksylowe, charakteryzują się zwiększoną zdolnością do oddawania elektronów, co czyni je bardziej reaktywnymi w porównaniu do resweratrolu.

Różnica między wartościami HOMO i LUMO, czyli przerwa energetyczna (eGAP), jest wskaźnikiem stabilności chemicznej oraz reaktywności. Związki o niższej wartości eGAP charakteryzują się większą reaktywnością, co może zwiększać ich potencjalną toksyczność wobec komórek. Kwercetyna i kaempferol miały najniższe wartości eGAP (odpowiednio 3,69 eV i 3,81 eV), co sugeruje ich wyższą reaktywność w porównaniu do innych flawonoidów.

7.1.2. Indeksy elektrofilowości i elektrodonorowości

Mirycetyna, z pięcioma grupami hydroksylowymi, wykazuje zwiększoną reaktywność i zdolność do tworzenia kompleksów z metalami. Wartości elektrofilowości (indeks elektrofilowy — Tabela 5) dla kwercetyny i kaempferolu są również stosunkowo wysokie, co sugeruje, że te związki mogą być bardziej reaktywne wobec nukleofilów, takich jak białka komórkowe lub DNA. Wartość indeksu elektrofilowego dla mirycetyny jest najwyższa spośród badanych związków, co wskazuje na szczególnie wysoką reaktywność tego flawonoidu w kontekście wiązania z nukleofilami, co może być istotne w tworzeniu kompleksów metal-ligand. Dodatkowo, wartości mocy elektrodonorowej dla kwercetyny i kaempferolu są stosunkowo niskie, co wskazuje na ich zdolność do oddawania elektronów. Związki o wyższej mocy elektrodonorowej mogą być bardziej skłonne do oddawania elektronów, co może prowadzić do generowania wolnych rodników i powodowania stresu oksydacyjnego w komórkach. Wyższa moc elektroakceptorowa mirycetyny i chryzyny wskazuje na ich zdolność do przyjmowania elektronów, co czyni je bardziej reaktywnymi w interakcjach redoks.

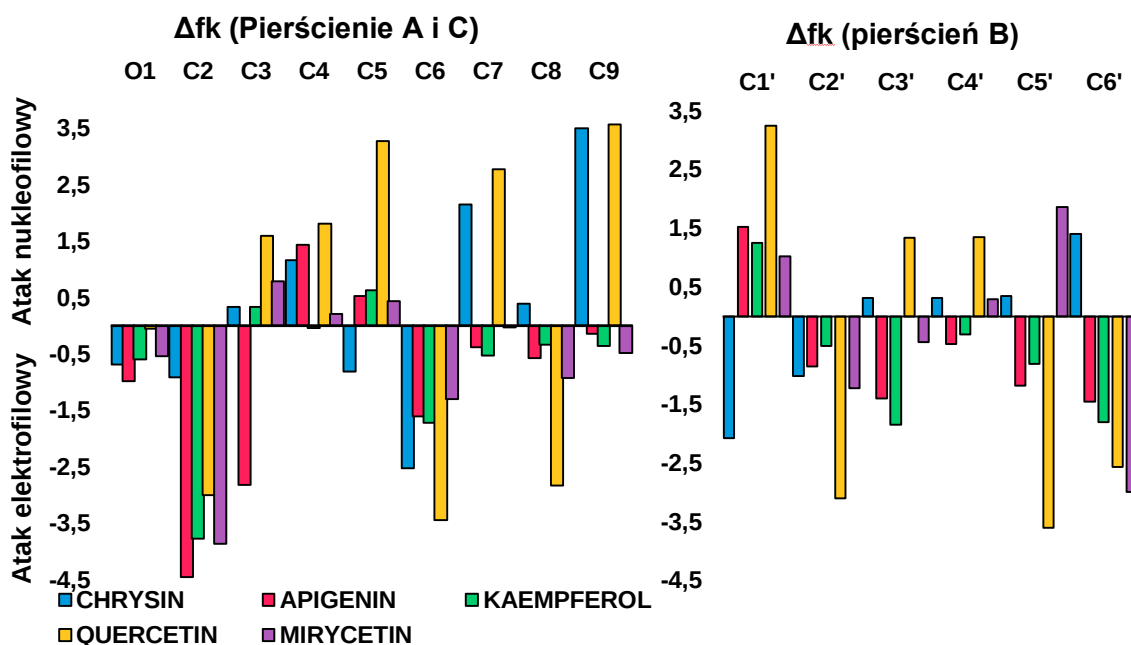
Tabela 5. Zestawienie wartości różnych parametrów energetycznych i elektronowych obliczonych dla badanych związków chemicznych

	RES	CHRY	API	KAM	QUE	MIR
HOMO [eV]	-5,61	-6,43	-6,24	-5,78	-5,65	-5,71
LUMO [eV]	-1,65	-2,04	-1,88	-1,97	-1,97	-2,06
Powinowactwo elektronowe	1,65	2,04	1,88	1,97	1,97	2,06
Potencjał joizacji	5,61	6,43	6,24	5,78	5,65	5,71
Elektroujemność	-3,63	-4,24	-4,06	-3,87	-3,81	-3,88
Twardość	1,98	2,19	2,18	1,91	1,84	1,83
Miękkość	0,50	0,46	0,46	0,52	0,54	0,55
eGAP	3,96	4,38	4,36	3,81	3,69	3,66
Potencjał echemiczny	3,63	4,24	4,06	3,87	3,81	3,88
Indeks elektrofilowy	3,33	4,09	3,78	3,93	3,94	4,13
Moc elektrodonorowa	-84,74	-124,71	-115,44	-88,73	-82,54	-84,21
Moc elektroakceptorowa	27,67	43,25	38,41	32,48	30,76	32,27
<i>Net</i> - elektrofilowość	-57,06	-81,46	-77,03	-56,24	-51,78	-51,94
Energia RB3LYP	-766,59	-878,75	-953,99	-1029,25	-1104,23	-1179,74
Energia punktów zerowych	0,23	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23
Pojemność Ciepłna przy stałej objętości	59,47	58,31	63,18	68,76	73,36	78,54
Entropia	126,76	118,68	124,73	134,48	139,66	146,55
Całkowita energia	140,67	156,72	166,31	175,34	176,84	190,60
Wydłużenie Wiązania	128,20	136,00	143,81	147,38	148,86	161,85
Zgięcie kąta	2,72	4,78	5,06	8,73	148,86	9,31
Energia rozciągania i zginania	3,81	4,81	7,02	6,27	5,95	6,89
Torsja	0,00	3,00	3,00	2,75	2,75	2,75
Siły van der Waalsa	5,80	7,35	7,02	11,10	11,06	11,14
Oddziaływanie elektrostatyczne	0,13	0,78	0,34	-0,89	-0,83	-1,33
Energia Pola Samouzgodnionego (SCF)	-766,59	-878,74	-953,99	-1029,25	-1104,23	-1179,74
Norma Gradientu RMS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Moment Dipolowy	2,14	3,84	2,47	5,47	4,23	6,78
Energia wibracyjna punktów zerowych	141,53	134,90	137,33	140,56	143,52	145,48
Suma Energii Elektronicznej i Punktów Zerowych	-766,36	-878,53	-953,77	-1029,02	-1104,01	-1179,51
Suma energii elektronowej i termicznej	-766,35	-878,52	-953,76	-1029,02	-1103,99	-1179,49
Suma entalpii elektronowej i termicznej	-766,35	-878,51	-953,76	-1029,00	-1103,99	-1179,48
Całkowita energia wolna systemu- suma energii elektronowej i termicznej	-766,41	-878,57	-953,82	-1029,07	-1104,05	-1179,55

7.1.3. Funkcja Fukui

Wyniki wskazują, że najbardziej reaktywne nukleofilowo są atomy w pierścieniu B, natomiast atomy w pierścieniu A i C wykazują skłonność do ataków elektrofilowych (Rysunek 8).

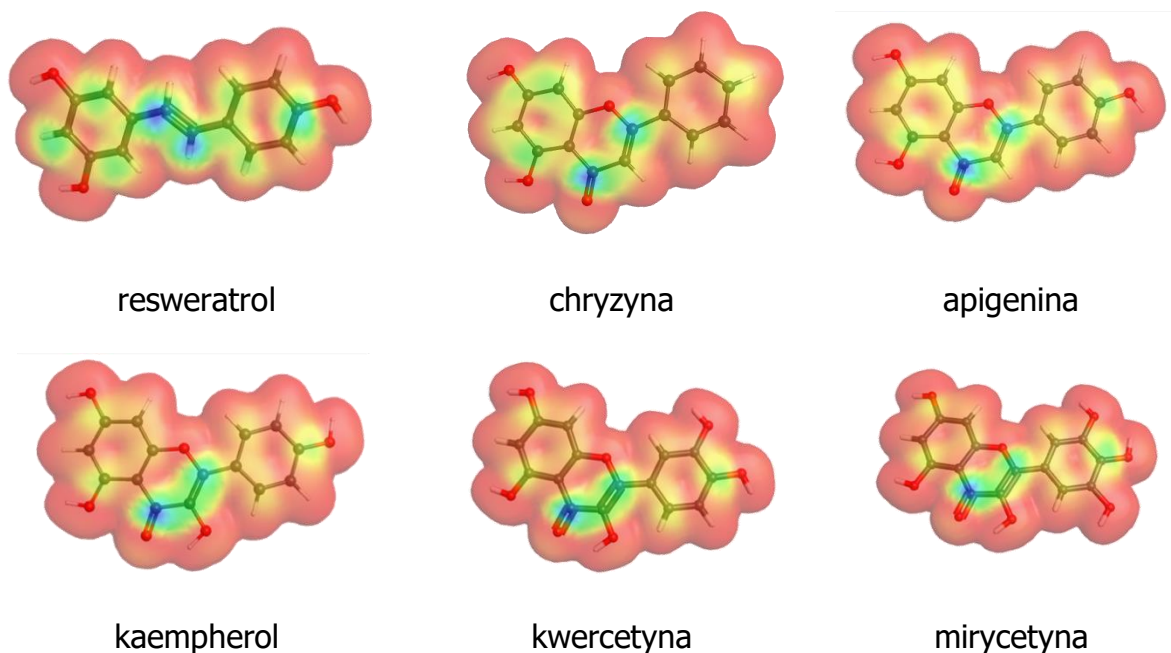
Na przykład, w cząsteczce chryzyny atom C9 okazał się być najbardziej podatny na atak nukleofilowy, natomiast atom C6 najbardziej podatny na atak elektrofilowy. W apigeninie zaobserwowano, że atom C1' w pierścieniu B preferuje reakcje nukleofilowe, podczas gdy C2 w pierścieniu A preferuje reakcje elektrofilowe. W kwercetynie i mirycetynie podobne tendencje obserwuje się dla atomów C9 i C5' odpowiednio, co świadczy o lokalnych miejscach reaktywności i potencjalnych miejscach oddziaływań z makrocząsteczkami biologicznymi, takimi jak białka czy DNA.



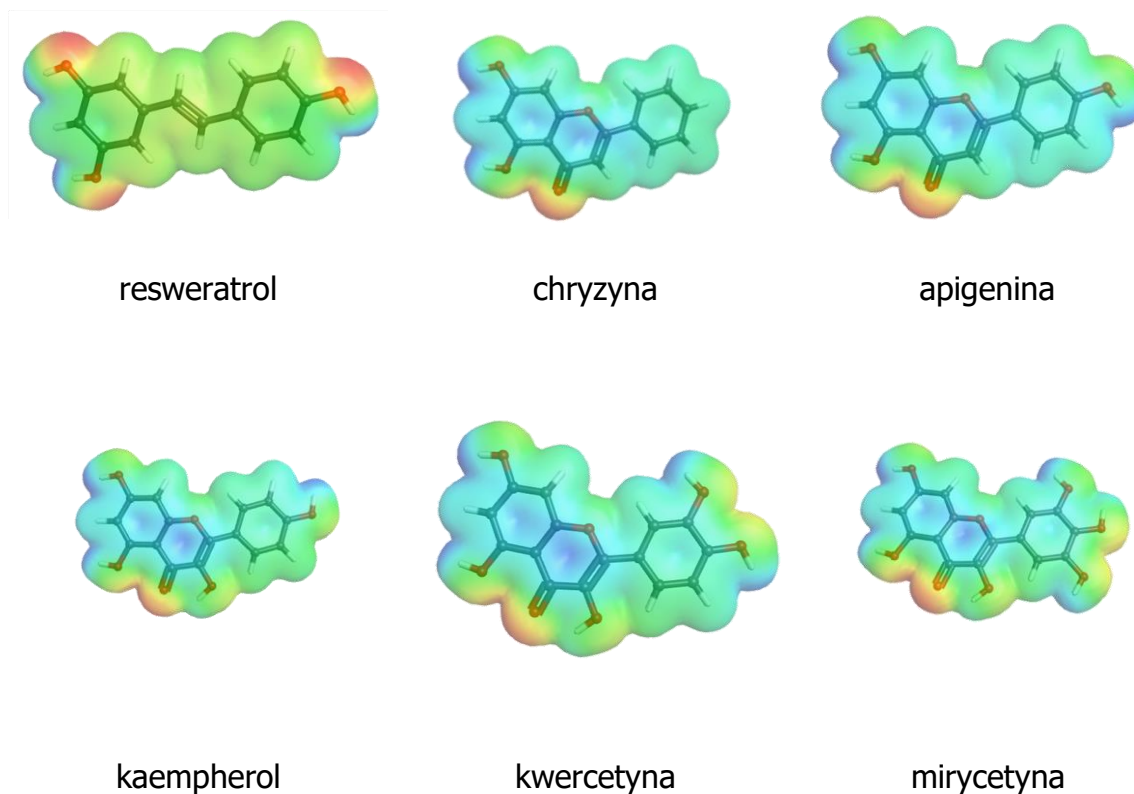
Rysunek 8. Wartości Δf_k prezentujące miejsca podatne na atak nukleofilowy i elektrofilowy w pierścieniu A i C oraz w pierścieniu B

7.1.4. Graniczna gęstość rodnikowa

Analiza granicznej gęstości rodnikowej (frontier radical density) umożliwiła identyfikację miejsc najbardziej podatnych na atak rodnikowy w badanych związkach. Związki takie jak kwercetyna i mirycetyna wykazują wyraźnie wyższe wartości granicznej gęstości rodnikowej, co oznacza, że te flawonoidy mogą być bardziej podatne na reakcje z wolnymi rodnikami, co ma istotne znaczenie w ich aktywności antyoksydacyjnej (Rysunek 9). Kolory na mapach potencjału elektrostatycznego (rysunek 10) wskazują, że regiony o wyższym stężeniu elektronów, takie jak te wokół atomów tlenu, są miejscami podatnymi na atak elektrofilowy.



Rysunek 9. Wizualizacja graniczna gęstość rodnikowa (frontier radical density), gdzie niebieski kolor wskazuje miejsca o największym prawdopodobieństwie ataku rodnika



Rysunek 10. Mapy potencjału elektrostatycznego cząsteczki, gdzie regiony czerwone oznaczają obszary o ujemnym potencjale, charakteryzujące się wyższym stężeniem elektronów, a regiony niebieskie reprezentują obszary o dodatnim potencjale, wskazujące na niższe stężenie elektronów

7.1.5. Bond Dissociation Energy (BDE)

Kwercetyna i mirycetyna, które posiadają wiele grup hydroksylowych, wykazują najniższe wartości BDE (71,11 eV i 71,01 eV odpowiednio), co sugeruje, że są one bardziej efektywne w neutralizacji rodników poprzez mechanizm przenoszenia wodoru (HAT). Wyższe wartości BDE, jak te zaobserwowane dla chryzyny (91,71 eV), wskazują na mniejszą zdolność tej cząsteczki do oddawania atomów wodoru, co może ograniczać jej zdolności antyoksydacyjne (Tabela 6).

Tabela 6. Wartości BDE policzone na zoptymalizowanych strukturach ligandów (Gaussian 09, B3LYP)

flawonoid	BDE
chryzyna	91,71
apigenina	81,92
kaempferol	83,2
kwercetyna	71,11
mirycetyna	71,01

7.1.6. Indeks aromatyczności

Indeks aromatyczności, obliczony przy użyciu modelu oscylatora harmonicznego (HOMA), dostarczył informacji o stabilności i reaktywności pierścieni aromatycznych w analizowanych flawonoidach. Najwyższa aromatyczność została zaobserwowana dla apigeniny, której wartość HOMA dla pierścienia B wynosiła 0,971, co sugeruje, że jest ona bardziej stabilna aromatycznie w porównaniu do innych związków. Z kolei chryzyna, z wartością HOMA na poziomie 0,650, wykazuje niższą aromatyczność, co może wpływać na jej reaktywność chemiczną.

Dla pierścienia A, wartości HOMA były dość zbliżone dla wszystkich związków, co sugeruje podobną stabilność aromatyczną w tej części cząsteczki. Wartości HOMA dla pierścienia C były ujemne, co wskazuje na mniejszą stabilność tego pierścienia i potencjalnie większą reaktywność (Tabela 7).

Tabela 7. Długości wiązań między atomami analizowanych flawonoidów A. między atomami węgla B. między atomami węgla i tlenu, C. pomiędzy atomami tlenu i wodoru

		pierścień	wiązanie	chryzyna	apigenina	kaempferol	kwercetyna	mirycetyna
węgiel-węgiel	B		C1'-C2'	1,476	1,405	1,406	1,412	1,406
			C2'-C3'	1,392	1,387	1,388	1,389	1,3852
			C3'-C4'	1,393	1,395	1,396	1,409	1,398
			C4'-C5'	1,395	1,398	1,395	1,395	1,399
			C5'-C6'	1,389	1,387	1,386	1,394	1,391
			C1'-C6'	1,404	1,403	1,410	1,407	1,405
			C5-C10	1,418	1,417	1,420	1,422	1,4197
			C5-C6	1,393	1,393	1,389	1,392	1,3889
			C6-C7	1,399	1,399	1,403	1,406	1,4025
			C7-C8	1,387	1,386	1,385	1,389	1,3853
			C8-C9	1,391	1,391	1,393	1,396	1,3931
			C9-C10	1,407	1,407	1,409	1,413	1,4092
			C					
węgiel-tlen	C		C9-C10	1,407	1,407	1,409	1,413	1,409
			O1-C2	1,365	1,366	1,377	1,379	1,356
			C2-C3	1,350	1,351	1,361	1,365	1,361
			C3-C4	1,463	1,460	1,467	1,467	1,467
			C4-C10	1,481	1,482	1,456	1,456	1,455
			C9-O1	1,368	1,368	1,355	1,358	1,377
			A					
			C7-O7	1,362	1,363	1,362	1,364	1,361
			C5-O5	1,352	1,353	1,352	1,355	1,352
			C					
			C3-O3			1,353	1,355	1,353
			B					
			C4'-O4'		1,364	1,366	1,364	1,357
tlen-wodór			C3'-O3'				1,368	1,378
			C5'-O5'					1,364
			A					
			O7-H7	0,963	0,963	0,963	0,966	0,963
			O5-H5	0,964	0,964	0,964	0,967	0,964
			C					
			O3-H3			0,981	0,985	0,982
	B		O4'-H4'		0,963	0,963	0,967	0,967
			O3'-H3'				0,966	0,962
			O5'-H5'					0,963

Tabela 8. Wartości obliczonego indeksu aromatyczności w analizowanych ligandach

pierścień		RES	CHRY	API	KAM	QUE
B	HOMA	0,650	0,971	0,960	0,937	0,962
	EN	0,106	0,016	0,021	0,044	0,024
	GEO	0,244	0,013	0,019	0,019	0,014
	Aj	0,892	0,994	0,992	0,992	0,994
	BAC	0,612	0,905	0,889	0,876	0,897
	Bird	75,378	94,150	92,836	92,799	93,692
A	HOMA	0,940	0,942	0,927	0,908	0,927
	EN	0,032	0,030	0,036	0,057	0,036
	GEO	0,029	0,028	0,037	0,035	0,037
	Aj	0,987	0,988	0,983	0,984	0,983
	BAC	0,880	0,883	0,851	0,856	0,851
	Bird	91,158	91,313	89,939	90,230	89,939
C	HOMA	-0,215	-0,212	-0,044	-0,074	-0,044
	EN	0,667	0,670	0,632	0,683	0,633
	GEO	0,548	0,542	0,411	0,391	0,412
	Aj					
	BAC					
	Bird	44,098	44,215	48,691	49,077	48,631

7.1.7. Analiza wartości Mullikena i NPA (Natural Population Analysis)

Przeprowadzona analiza wykazała, że atomy tlenu (O) w strukturach flawonoidów posiadają ujemne ładunki, co sugeruje ich wysoką reaktywność jako donorów elektronów. Atomy węgla (C) charakteryzują się wartościami ładunków zbliżonymi do zera, co wskazuje na ich neutralny wpływ na dystrybucję elektronów. Podobnie, atomy wodoru (H) wykazują ładunki bliskie zeru, co jest typowe dla cząsteczek organicznych, gdzie wodór nie pełni kluczowej roli w redystrybucji ładunku

(Tabela 9).

Tabela 9. Rozkład ładunków elektronowych na poszczególnych atomach obliczone w programie Gaussian 09² (Metoda Mullikena).

RES		CHRY			API			KAM			QUE			MIR
1	O	-0,22	1	O	0,04	1	O	0,04	1	O	0,03	1	O	0,04
2	O	-0,21	2	O	-0,14	2	O	-0,14	2	O	-0,24	2	O	-0,23
3	O	-0,22	3	O	-0,28	3	O	-0,28	3	O	-0,16	3	O	-0,15
4	C	1,28	4	O	-0,20	4	O	-0,20	4	O	-0,34	4	O	-0,33
5	C	1,25	5	C	1,48	5	O	-0,22	5	O	-0,20	5	O	-0,20
6	C	0,11	6	C	-1,46	6	C	1,93	6	O	-0,23	6	O	-0,23
7	C	0,09	7	C	0,72	7	C	-1,66	7	C	0,37	7	O	-0,30
8	C	-1,28	8	C	-0,45	8	C	0,73	8	C	-0,10	8	C	1,80
9	C	-0,68	9	C	1,37	9	C	1,42	9	C	0,30	9	C	-1,41
10	C	-0,19	10	C	0,64	10	C	-0,54	10	C	-0,64	10	C	0,51
11	C	-0,45	11	C	-0,58	11	C	-0,64	11	C	-0,39	11	C	1,19
12	C	-1,02	12	C	-0,77	12	C	0,48	12	C	1,58	12	C	0,11
13	C	0,00	13	C	-0,68	13	C	-0,91	13	C	0,28	13	C	-0,01
14	C	0,70	14	C	0,62	14	C	-0,67	14	C	-0,35	14	C	0,38
15	C	-0,26	15	C	0,14	15	C	0,65	15	C	-0,60	15	C	-0,77
16	C	0,00	16	C	-1,07	16	C	-1,00	16	C	0,43	16	C	-0,70
17	C	-0,74	17	C	-0,37	17	C	0,27	17	C	-0,56	17	C	-0,35
18	H	-0,03	18	C	-0,41	18	C	-0,29	18	C	0,06	18	C	0,77
19	H	-0,06	19	C	-0,39	19	C	-0,30	19	C	-0,67	19	C	-0,93
20	H	0,19	20	H	0,22	20	C	-0,58	20	C	-0,18	20	C	-0,01
21	H	0,20	21	H	0,20	21	H	0,21	21	C	-0,52	21	C	-0,29
22	H	0,11	22	H	0,10	22	H	0,20	22	H	0,20	22	C	0,56
23	H	0,18	23	H	0,16	23	H	0,10	23	H	0,10	23	H	0,17
24	H	0,10	24	H	0,07	24	H	0,08	24	H	0,19	24	H	0,13
25	H	0,21	25	H	0,18	25	H	0,16	25	H	0,15	25	H	0,08
26	H	0,14	26	H	0,19	26	H	0,16	26	H	0,20	26	H	0,15
27	H	0,26	27	H	0,16	27	H	0,21	27	H	0,16	27	H	0,11
28	H	0,26	28	H	0,26	28	H	0,26	28	H	0,30	28	H	0,42
29	H	0,26	29	H	0,27	29	H	0,26	29	H	0,27	29	H	0,38
						30	H	0,27	30	H	0,27	30	H	0,37
									31	H	0,26	31	H	0,37
												32	H	0,38
														33
														0,29

² Wszystkie obliczenia zostały wykonane wykorzystując zoptymalizowaną geometrię związków macierzystych obliczonych zgodnie z teorią HF i B3LYP z wykorzystaniem baz 6-31G** i 6-311+ G**. Kationy oraz aniony wybranych cząsteczek będące cząsteczkami o otwartej powłoce- ich energie i funkcje falowe zostały obliczone za pomocą pojedynczej anihilacji (stan kwartetu jest projektowany na stan dubletowy) metodą UHF.

Wyniki analizy metodą Natural Population Analysis (NPA) potwierdzają, że atomy tlenu (O) mają wyraźnie ujemne ładunki, co oznacza nadmiar elektronów, czyniący je potencjalnymi donorami elektronów w reakcjach chemicznych. Jest to szczególnie istotne w kontekście ich udziału w reakcjach antyoksydacyjnych.

Atomy węgla (C) w analizowanych cząsteczkach utrzymują wartości ładunków zbliżone do zera, co wskazuje na ich niewielki udział w procesach redystrybucji elektronów. Atomy wodoru (H) również wykazują minimalne odchylenia od neutralności, co potwierdza ich ograniczoną rolę w oddziaływaniach elektrostatycznych w strukturach flawonoidów.

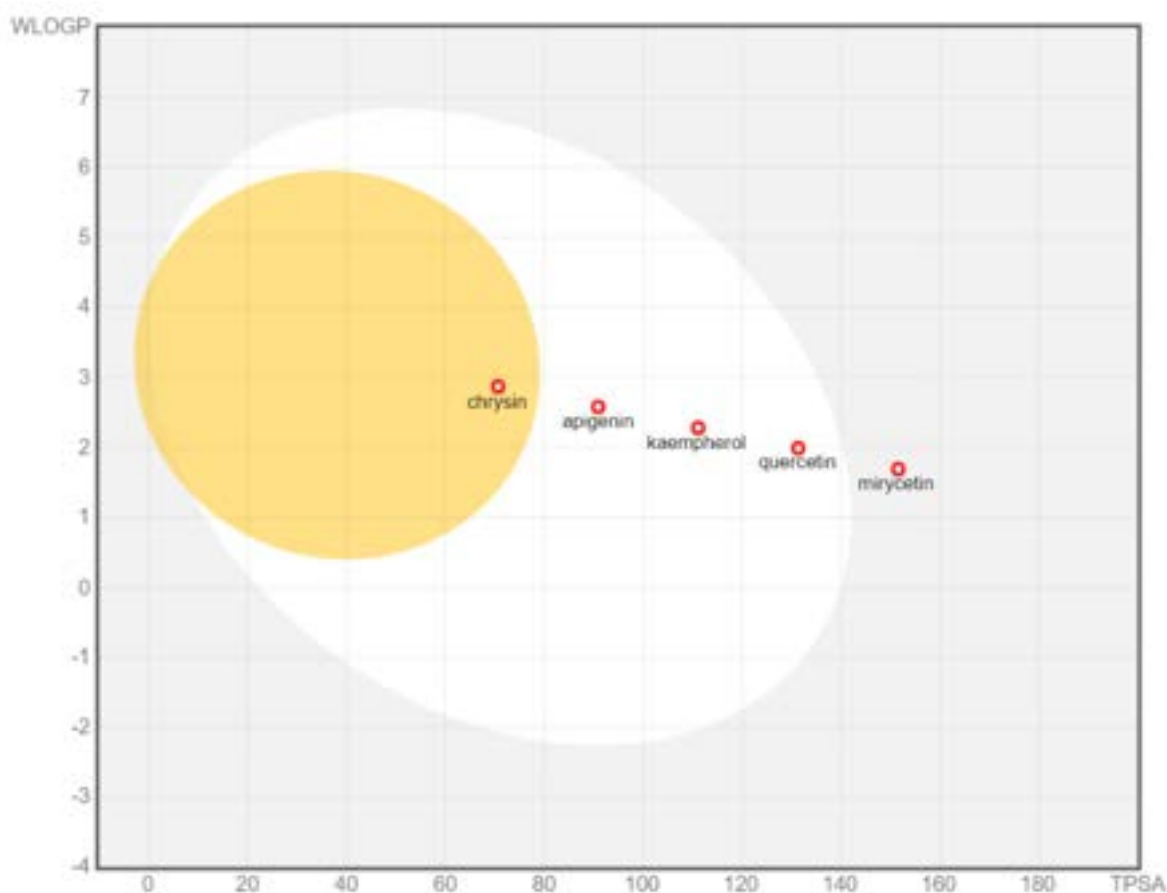
Tabela 10. Natural Population Analysis (NPA) obliczone w programie Gaussian 09. Rozkład ładunków elektronowych i populacji elektronowych na poszczególnych atomach – naturalne orbitale atomowe³.

		RES		CHRY		API		KAM		QUE		MIR		
1	O	-0,67	1	O	-0,50	1	O	-0,50	1	O	-0,47	1	O	-0,50
2	O	-0,67	2	O	-0,62	2	O	-0,62	2	O	-0,71	2	O	-0,69
3	O	-0,67	3	O	-0,57	3	O	-0,57	3	O	-0,63	3	O	-0,63
4	C	-0,04	4	O	-0,66	4	O	-0,66	4	O	-0,61	4	O	-0,61
5	C	-0,11	5	C	-0,25	5	O	-0,66	5	O	-0,66	5	O	-0,66
6	C	-0,17	6	C	0,38	6	C	-0,25	6	O	-0,67	6	O	-0,66
7	C	-0,15	7	C	0,38	7	C	0,38	7	C	-0,25	7	O	-0,71
8	C	-0,27	8	C	0,48	8	C	0,38	8	C	0,39	8	C	-0,65
9	C	-0,25	9	C	-0,11	9	C	-0,14	9	C	0,30	9	C	-0,25
10	C	0,33	10	C	0,41	10	C	0,48	10	C	0,46	10	C	0,30
11	C	0,34	11	C	-0,32	11	C	-0,33	11	C	0,20	11	C	0,39
12	C	-0,16	12	C	-0,32	12	C	0,41	12	C	-0,13	12	C	-0,09
13	C	-0,16	13	C	0,36	13	C	-0,32	13	C	0,39	13	C	0,20
14	C	-0,36	14	C	-0,38	14	C	0,36	14	C	-0,32	14	C	0,46
15	C	-0,24	15	C	-0,17	15	C	-0,38	15	C	0,36	15	C	0,39
16	C	-0,28	16	C	-0,15	16	C	-0,13	16	C	-0,36	16	C	-0,32
17	C	0,32	17	C	-0,20	17	C	-0,15	17	C	-0,14	17	C	-0,26
18	H	0,19	18	C	-0,20	18	C	-0,28	18	C	-0,14	18	C	-0,25
19	H	0,19	19	C	-0,19	19	C	-0,25	19	C	-0,25	19	C	0,36
20	H	0,21	20	H	0,23	20	C	0,33	20	C	-0,29	20	C	-0,36
21	H	0,21	21	H	0,23	21	H	0,23	21	C	0,33	21	C	0,28
22	H	0,20	22	H	0,20	22	H	0,23	22	H	0,23	22	C	0,26
23	H	0,20	23	H	0,22	23	H	0,20	23	H	0,20	23	H	0,25
24	H	0,19	24	H	0,21	24	H	0,21	24	H	0,24	24	H	0,23
25	H	0,22	25	H	0,21	25	H	0,22	25	H	0,22	25	H	0,22
26	H	0,20	26	H	0,21	26	H	0,20	26	H	0,22	26	H	0,23
27	H	0,47	27	H	0,21	27	H	0,22	27	H	0,20	27	H	0,20
28	H	0,47	28	H	0,46	28	H	0,46	28	H	0,50	28	H	0,50
29	H	0,47	29	H	0,47	29	H	0,47	29	H	0,46	29	H	0,47
						30	H	0,47	30	H	0,47	30	H	0,47
									31	H	0,47	31	H	0,47
												32	H	0,48
														0,49

³ Numeracja w RES nie jest zgodna z zasadami numeracji atomów. Na potrzeby porównania struktury dwóch klas związków zastosowano ujednolicone oznaczenia z pominięciem pierścienia C.

7.2. Analiza biodostępności

Analiza rozkładu analizowanych flawonoidów na osiach WLOGP (oś Y) i TPSA (oś X) pokazuje, że chryzyna jest jedynym flawonoidem spośród całej serii ligandów, który charakteryzuje się wartościami tych dwóch parametrów umożliwiającymi penetrację przez barierę krew-mózg. Pozostałe związki, z wyjątkiem mirycetyny, mają wartości WLOGP i TPSA umożliwiające pasywną absorpcję z przewodu pokarmowego. Na rysunku można zauważyć wyraźny trend malejącej absorpcji w kierunku od chryzyny do mirycetyny, co podkreśla fakt ograniczonej biodostępności spowodowanej większą liczbą grup hydroksylowych w cząsteczce flawonoidu.



Rysunek 11. Wykres zależności wartości WlogP od TPSA (Wizualizacja otrzymana w Swissadme.org)

Analiza parametrów chemicznych i biologicznych dla sześciu związków, tj. resweratrolu, chryzyny, apigeniny, kaempferolu, kwercetyny i MIR, ujawnia zróżnicowane profile tych cząsteczek. Masa cząsteczkowa i liczba atomów ciężkich zwiększa się sekwencyjnie od resweratrolu do mirycetyny, co koreluje z rosnącą liczbą akceptorów i donorów wiązań wodorowych oraz polem powierzchni polarnego powierzchniowego (TPSA). Związki te wykazują również różnice w przewidywanej rozpuszczalności, z

mirycetyną wykazującą najwyższą rozpuszczalność według modelu Silicos-IT. W kontekście absorpcji w przewodzie pokarmowym, wszystkie związki, z wyjątkiem MIR, charakteryzują się wysoką absorpcją. Inhibicja cytochromów P450 jest zróżnicowana, z kilkoma związkami wykazującymi potencjał inhibicji wielu izoform. Związki te generalnie spełniają kryteria reguł Lipińskiego, Ghose'a, Vebera, Egana i Muegge, z wyjątkiem MIR, która wykazuje kilka naruszeń. Wartości *bioavailability* są jednolite dla wszystkich związków, podczas gdy alert PAINS i Brenk jest obecny dla kwercetyny i mirycetyny. Dostępność syntetyczna związków również rośnie sekwencyjnie, co sugeruje zwiększoną złożoność syntez w przypadku MIR

Układ woda - n-oktanol nie jest w stanie naśladować wyraźnego charakteru międzyfazowego, który jest nadawany przez mikrośrodowisko utworzone przez wodę i polarne grupy fosfolipidów błonowych. Chryzyna, z wartością Consensus LogP 2,55, wykazuje większą lipofilowość w porównaniu z mirycetyną, której wartość wynosi 0,79.

Wszystkie badane flawonoidy mieszczą się w tym zakresie, co wskazuje na ich potencjalną przydatność jako kandydatów na leki doustne. Jednak bardziej lipofilowe związki, takie jak CHRY, mogą wykazywać niższą rozpuszczalność w wodzie, co negatywnie wpływa na ich biodostępność. Takie związki mogą również być sekwestrowane przez tkankę tłuszczową, co utrudnia ich wydalanie i może prowadzić do akumulacji i zwiększonej toksyczności systemowej. W odniesieniu do absorpcji doustnej i jelitowej, idealna wartość LogP wynosi od 1,35 do 1,8. Flawonoidy takie jak RES i QUE, z wartościami ilogP odpowiednio 1,71 i 1,63, mieszczą się w tym zakresie, co sugeruje ich potencjalną zdolność do efektywnej absorpcji doustnej i jelitowej.

Tabela 11. Metody obliczania lipofilowości: porównanie różnych deskryptorów logP

Nazwa	Opis deskryptora	RES	CHRY	API	KAMI	QUE	MIR
iLOGP	Obliczany za pomocą metody opartej na atomowych współczynnikach kontrybucji. Reprezentuje miarę lipofilowości związku chemicznego, uwzględniającą strukturalne i atomowe właściwości cząsteczki.	1,71	2,27	1,89	1,7	1,63	1,08
XLOGP3	Uwzględnia złożone parametry strukturalne cząsteczki, opierając się na atomowych współczynnikach kontrybucji.	3,13	3,52	3,02	1,9	1,54	1,18
WLOGP	Obliczana metodą fragmentalną. Estymuje lipofilowość związku chemicznego na podstawie sumy kontrybucji lipofilowych poszczególnych fragmentów molekularnych.	2,76	2,87	2,58	2,28	1,99	1,69
miLogP	Obliczana za pomocą metody Moriguchi. Uwzględnia efekty polarności i sąsiedztwa atomów w cząsteczce, oferując precyzyjne estymacje lipofilowości dla szerokiego zakresu związków.	2,99	2,94	2,46	2,17	1,68	1,39
Silicos-IT Log P	obliczany za pomocą algorytmów uczenia maszynowego i baz danych z eksperymentalnymi wartościami LogP. Łączy zalety metod atomowych i fragmentalnych z zaawansowanymi technikami modelowania.	2,57	3,02	2,52	2,03	1,54	1,06
Consensus Log P	obliczana jako średnia z wielu różnych metod obliczeniowych. Ma na celu zwiększenie precyzji i niezawodności estymacji lipofilowości przez kombinację wyników z różnych metod.	2,48	2,55	2,11	1,58	1,23	0,79

Większe cząsteczki, z uwagi na swoją złożoną strukturę, mają bardziej skomplikowane rozkłady elektronowe, co bezpośrednio wpływa na wartość energii SCF. W przypadku większych cząsteczek, zwiększona liczba atomów i elektronów prowadzi do złożonych interakcji elektronowych, które są uwzględniane podczas obliczeń energii SCF.

Obserwacja proporcjonalnej stabilnością energetyczną cząsteczki a jej lipofilowością. W tym przypadku, bardziej ujemne wartości energii SCF, wskazują na większą stabilność związku i są skorelowane z niższymi wartościami MiLogP, co sugeruje ich mniejszą lipofilowość. Tabela 12 zawiera zestaw deskryptorów, które są niezbędne do oceny i analizy właściwości fizykochemicznych, farmakokinetycznych i farmakodynamicznych związków chemicznych w kontekście odkrywania leków. (W tabeli przedstawione są oryginalne nazwy parametrów dostępne na platformach (tox-new.charite.de ; molinspiration.com)). W analizie uwzględniono również deskryptory związane z potencjalnym hamowaniem aktywności cytochromów P450. Obliczone właściwości ADMET (wchłanianie z przewodu pokarmowego, przenikanie przez barierę krew-mózg, inhibicja systemu cytochromu P450, substrat dla glikoproteiny P).

Tabela 12. Analiza deskryptorów fizykochemicznych i farmakokinetycznych resweratrolu i badanych flawonoidów

	reswatrol	chryzyna	apigenina	kaempherol	kwercetyna	mirycetyna
MW	228,24	254,24	270,24	286,24	302,24	318,24
#Heavy atoms	17	19	20	21	22	23
#Aromatic heavy atoms	12	16	16	16	16	16
Fraction Csp3	0	0	0	0	0	0
#Rotatable bonds	2	1	1	1	1	1
#H-bond acceptors	3	4	5	6	7	8
#H-bond donors	3	2	3	4	5	6
MR	67,88	71,97	73,99	76,01	78,03	80,06
TPSA	60,69	70,67	90,9	111,13	131,36	151,59
ESOL Log S	-3,62	-4,19	-3,94	-3,31	-3,16	-3,01
ESOL Solubility (mg/ml)	5,5 10 ⁻⁰²	1,64 10 ⁻⁰²	3,07 10 ⁻⁰²	1,40 10 ⁻⁰¹	2,11 10 ⁻⁰¹	3,14 10 ⁻⁰¹
ESOL Solubility (mol/l)	5,5 10 ⁻⁰⁴	1,64 10 ⁻⁰²	1,14 10 ⁻⁰⁴	4,90 10 ⁻⁰⁴	6,98 10 ⁻⁰⁴	9,88 10 ⁻⁰⁴
ESOL Class	S	MS	S	S	S	S
Ali Log S	-4,07	-4,69	-4,59	-3,86	-3,91	-3,96
Ali Solubility (mg/ml)	1,93 10 ⁻⁰²	5,22 10 ⁻⁰³	6,88 10 ⁻⁰³	3,98 10 ⁻⁰²	3,74 10 ⁻⁰²	3,50 10 ⁻⁰²
Ali Solubility (mol/l)	8,44 10 ⁻⁰⁵	2,05 10 ⁻⁰⁵	2,55 10 ⁻⁰⁵	1,39 10 ⁻⁰⁴	1,24 10 ⁻⁰⁴	1,10 10 ⁻⁰⁴
Ali Class	MS	MS ⁴	MS	S ⁵	S	S
Silicos-IT LogSw	-3,29	-4,98	-4,4	-3,82	-3,24	-2,66
Silicos-IT Solubility (mg/ml)	1,18 10 ⁻⁰¹	2,64 10 ⁻⁰³	1,07 10 ⁻⁰²	4,29 10 ⁻⁰⁴	1,73 10 ⁻⁰¹	6,98 10 ⁻⁰¹
Silicos-IT Solubility (mol/l)	5,16 10 ⁻⁰⁴	1,04 10 ⁻⁰⁵	3,94 10 ⁻⁰⁵	1,50 10 ⁻⁰⁴	5,73 10 ⁻⁰⁴	2,19 10 ⁻⁰³
Silicos-IT class	S	MS	MS	S	S	S
GI absorption	H ⁶	H	H	H	H	L
BBB permeant	+	+	-	-	-	-
Pgp substrate	-	-	-	-	-	-
CYP1A2 inhibitor	+	+	+	+	+	+
CYP2C19 inhibitor	-	-	-	-	-	-
CYP2C9 inhibitor	+	-	-	-	-	-
CYP2D6 inhibitor	-	+	+	+	+	-
CYP3A4 inhibitor	+	+	+	+	+	+
log Kp (cm/s)	-5,47	-5,35	-5,8	-6,7	-7,05	-7,4
Lipinski #violations	0	0	0	0	0	1
Ghose #violations	0	0	0	0	0	0
Veber #violations	0	0	0	0	0	1
Egan #violations	0	0	0	0	0	1
Muegge #violations	0	0	0	0	0	2
Bioavailability Score	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55

⁴ MS- Moderately soluble- średnio rozpuszczalne

⁵ S- Soluble; rozpuszczalne

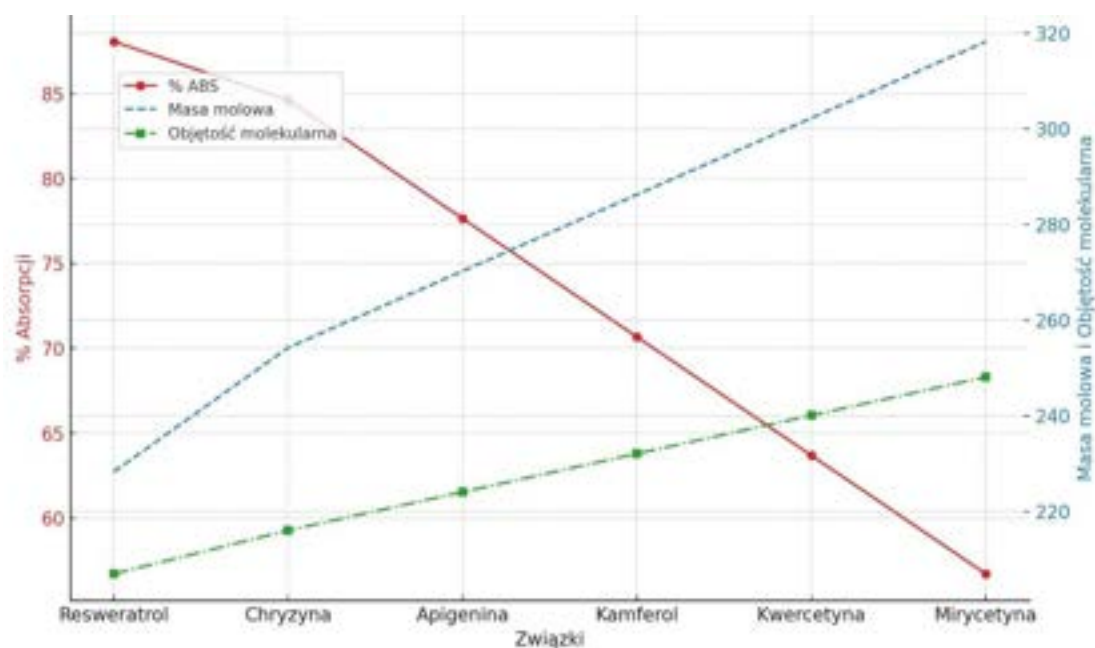
⁶ H-High/wysoki, L-Low/niski

PAINS #alerts	0	0	0	0	1	1
Brenk #alerts	1	0	0	0	1	1
Leadlikeness #violations	1	1	0	0	0	0
Synthetic Accessibility	2,02	2,93	2,96	3,14	3,23	3,27

MW: Masa cząsteczkowa; #Heavy atoms: Liczba ciężkich atomów; #Aromatic heavy atoms: Liczba aromatycznych ciężkich atomów; Fraction Csp3: Udział atomów węgla o hybrydyzacji sp³; #Rotatable bonds: Liczba wiązań obrotowych; #H-bond acceptors: Liczba akceptorów wiązań wodorowych; #H-bond donors: Liczba donorów wiązań wodorowych; MR: Masa zredukowana; TPSA: Powierzchnia polarna topologiczna; ESOL Log S: Logarytm współczynnika rozpuszczalności obliczony metodą ESOL; ESOL Solubility (mg/ml): Rozpuszczalność obliczona metodą ESOL w mg/ml; ESOL Solubility (mol/l): Rozpuszczalność obliczona metodą ESOL w mol/l; ESOL Class: Klasa rozpuszczalności ESOL; Ali Log S: Logarytm współczynnika rozpuszczalności obliczony metodą Ali; Ali Solubility (mg/ml): Rozpuszczalność obliczona metodą Ali w mg/ml; Ali Solubility (mol/l): Rozpuszczalność obliczona metodą Ali w mol/l; Ali Class: Klasa rozpuszczalności Ali; Silicos-IT LogSw: Logarytm współczynnika rozpuszczalności wodnej obliczony metodą Silicos-IT; Silicos-IT Solubility (mg/ml): Rozpuszczalność wodna obliczona metodą Silicos-IT w mg/ml; Silicos-IT Solubility (mol/l): Rozpuszczalność wodna obliczona metodą Silicos-IT w mol/l; Silicos-IT class: Klasa rozpuszczalności Silicos-IT; GI absorption: Absorpcja w przewodzie pokarmowym; BBB permeant: Przenikanie przez barierę krew-mózg; Pgp substrate: Substrat dla glikoproteiny P; CYP1A2 inhibitor: Inhibitor CYP1A2 (dot. wszystkich izoform cytochromów); log Kp (cm/s): Logarytm współczynnika przenikania; Lipinski #violations: Liczba naruszeń reguły Lipińskiego; Ghose #violations: Liczba naruszeń reguły Ghose; Veber #violations: Liczba naruszeń reguły Vebera; Egan #violations: Liczba naruszeń reguły Egana; Muegge #violations: Liczba naruszeń reguły Muegge; Bioavailability Score: Wynik biodostępności; PAINS #alerts: Liczba alertów PAINS; Brenk #alerts: Liczba alertów Brenka; Leadlikeness #violations: Liczba naruszeń reguły podobieństwa zestawu bazowego wykazujących pożądaną aktywność biologiczną i stanowiących punkt wyjścia do dalszej optymalizacji w celu uzyskania leku; Synthetic Accessibility: Dostępność syntetyczna.

Związki te wykazują również różnice w przewidywanej absorpcji w przewodzie pokarmowym (GI absorption) i zdolności do przechodzenia przez barierę krew-mózg (BBB permeant). Wszystkie związki, z wyjątkiem mirycetyny, mają wysoką absorpcję w przewodzie pokarmowym, ale tylko resweratrol i chryzyna są zdolne do przechodzenia przez barierę krew-mózg.

Wykres (Rysunek 13) przedstawia zależność pomiędzy procentem absorpcji (% ABS), masą molową oraz objętością molekularną badanych związków: resweratrolu, chryzyny, apigeniny, kamferolu, kwercetyny i mirycetyny. Silna korelacja została zaobserwowana zarówno pomiędzy % ABS a masą molową ($R^2 = 0,97$), jak i pomiędzy % ABS a objętością molekularną ($R^2 = 0,99$), co sugeruje, że większa masa i objętość cząsteczek mogą wpływać na ich zdolność absorpcyjną.

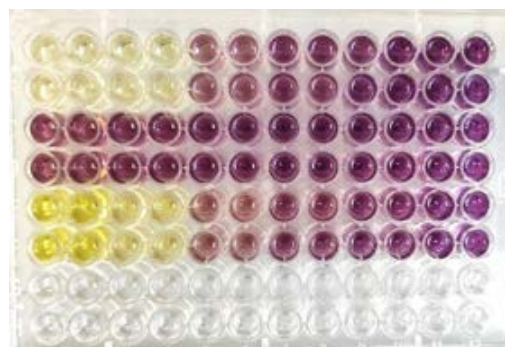
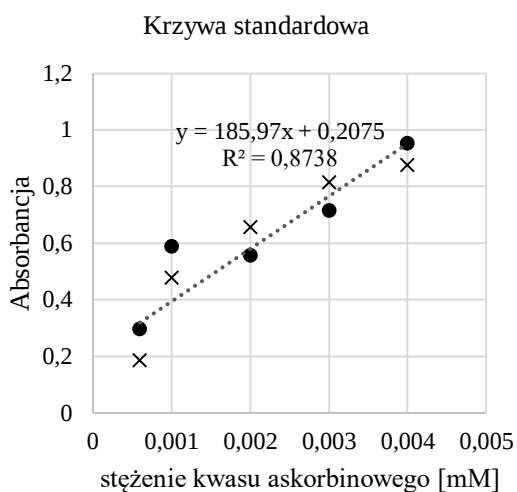


Rysunek 12. Zależność pomiędzy stopniem absorpcji, masą molową i objętością molekularną dla badanych związków

7.3. Właściwości antyoksydacyjne

7.3.1. Metoda DPPH

Zaobserwowano, że wartość VCEAC była najwyższa dla kaempferolu oraz kwercetyny. Oznacza to, że obie te substancje wykazały silniejszą zdolność do wygaszania rodników DPPH w porównaniu z innymi badanymi substancjami. Kaempferol i kwercetyna są flawonoidami, które są znane z silnych właściwości przeciwutleniających. Ich wysoka zdolność do neutralizacji rodników DPPH potwierdza ich efektywność jako antyoksydantów.

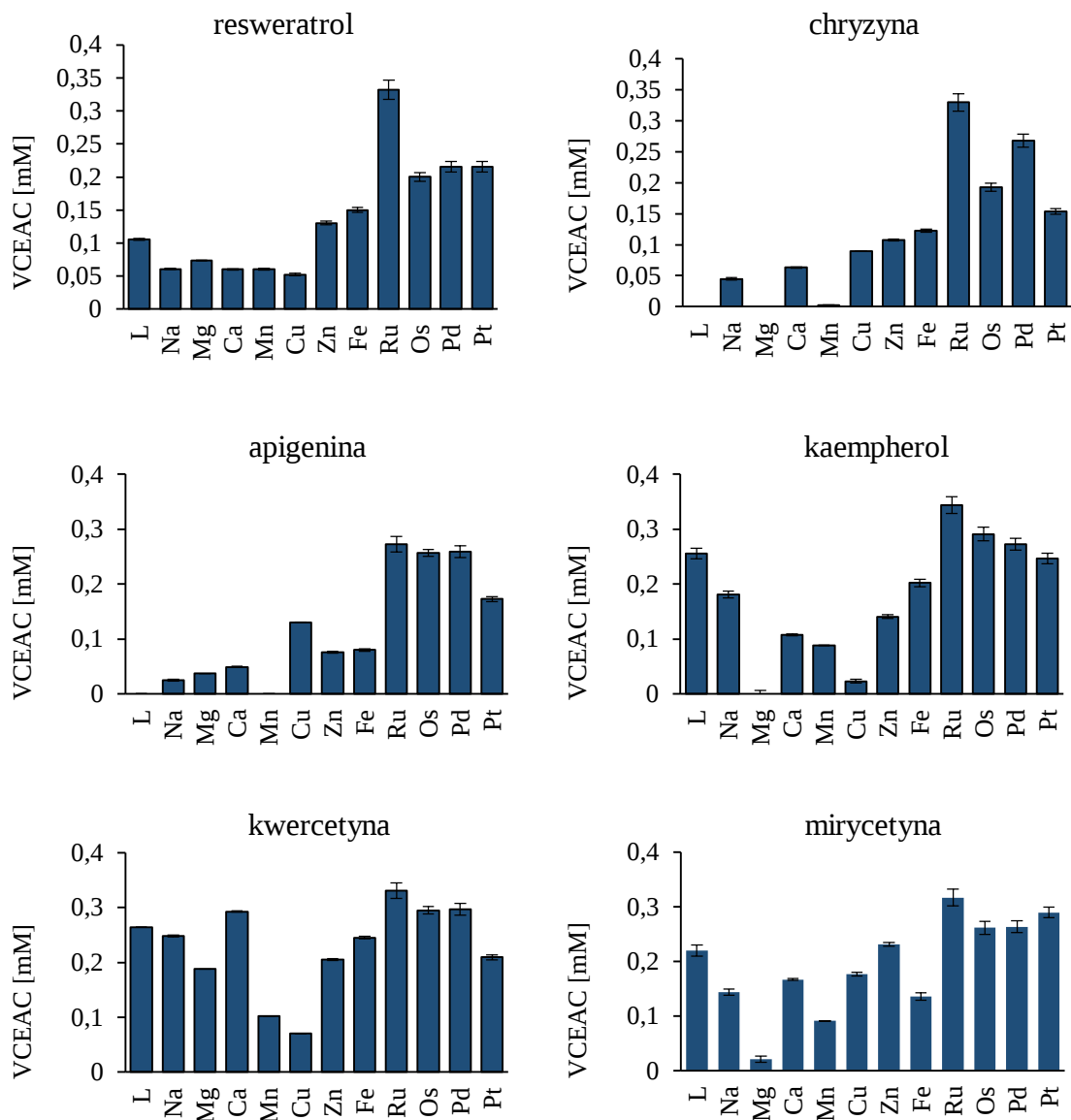


Płytką 96-dółkową po 30 minutowej inkubacji ligandów z odczynnikiem DPPH. Analiza porównawcza. Trzeci i czwarty rząd odpowiadający chryzynie i apigeninie- brak widocznej redukcji rodnika w badanym zakresie stężeń.

Rysunek 13. A. Krzywa standardowa zależności absorbancji od stężenia witaminy C B. Fotografia płytki 96-dółkowej z naniesionymi ligandami po 30 minutach inkubacji z roztworem DPPH.

Wśród metalokompleksów najwyższą zdolność do redukcji syntetycznego rodnika wykazały związki z rutenem. Ruten jest metalicznym pierwiastkiem przejściowym, który często tworzy kompleksy o znaczących właściwościach redoks. Możliwe jest, że właśnie te właściwości przyczyniły się do wysokiej zdolności antyoksydacyjnej metalokompleksów z rutenem (Rysunek 14).

Jednakże, warto zauważyć, że nie wszystkie metalokompleksy prezentują wysokie właściwości antyoksydacyjne. W przypadku kompleksów utworzonych z jonami metali alkalicznych o małym promieniu jonowym, zaobserwowano obniżenie zdolności antyoksydacyjnych. Może to wynikać z różnic w strukturze elektronowej tych kompleksów lub z ich interakcji z rodnikami.



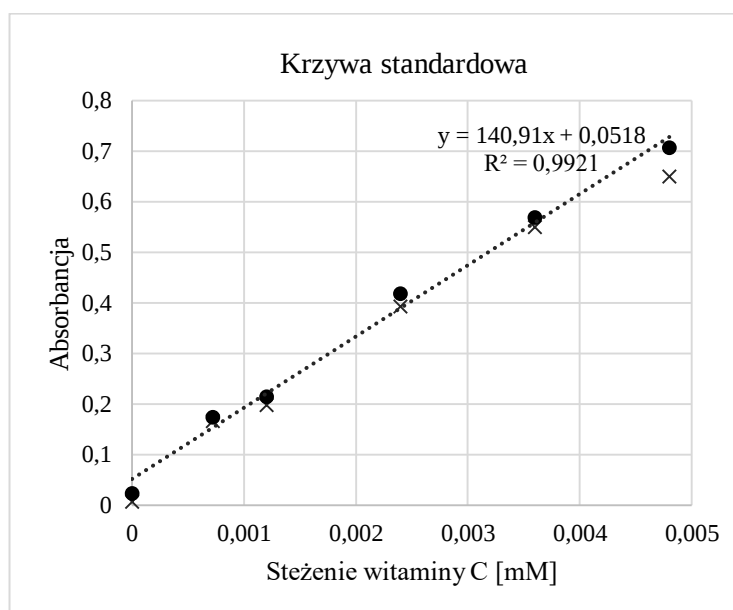
Rysunek 14. Wartości VCEAC [mM] dla ligandów i metalokompleksów wyznaczone metodą DPPH. Na osi Y oznaczono milimolowe stężenie kwasu askorbinowego, które w identycznych warunkach wykazuje aktywność.

7.3.2. Metoda ABTS

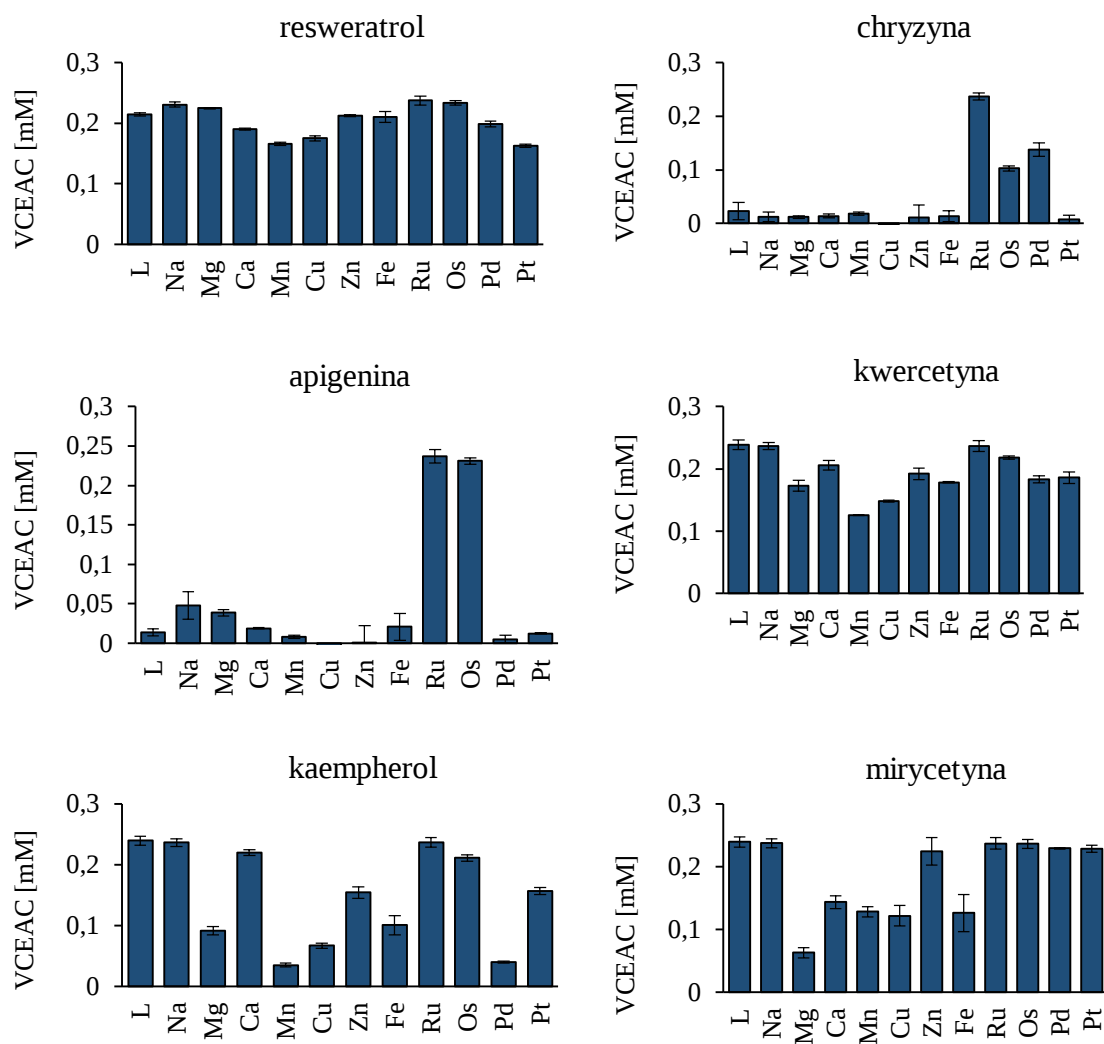
W metodzie ABTS uzyskane wyniki dla różnych ligandów okazały się być zbliżone do wyników eksperymentu z redukcją rodnika DPPH. Co ciekawe, we wszystkich przypadkach kompleksy z osmem i rutenem prezentowały silne właściwości antyoksydacyjne nawet, w przypadku, w której sam ligand nie wykazywał zdolności do redukcji rodnika w danym eksperymencie (apigenina, chryzyna). Dodatkowe eksperymenty z samymi roztworami osmu i rutenu wskazały, że interakcja jonów tych metali z reagentami używanymi w testach ABTS i DPPH może prowadzić do fałszywie dodatnich wyników.

Może to sugerować, że w obecności tych metali dochodzi do reakcji, które niekoniecznie odzwierciedlają właściwości antyoksydacyjne badanych związków, lecz wynikają z innych mechanizmów reakcyjnych. Na tej podstawie zdecydowano, że kompleksy z rutenem i osmem, w przeciwieństwie do pierwotnych przypuszczeń, nie tworzą stabilnych związków. Obecność wolnych jonów w roztworze może wpływać na wyniki testów antyoksydacyjnych. To zjawisko stanowi istotny obszar zainteresowania, wymagający głębszego zrozumienia, w szczególności z uwzględnieniem potencjalnych zdolności akceptorowo-donorowych jonu metalu w kompleksach

Rysunek 16. przedstawia wartości VCEAC dla badanych ligandów i metalokompleksów. Wyższe wartości VCEAC (określona na podst. krzywej standardowej- Rysunek 15) wskazują na lepsze właściwości antyoksydacyjne badanych substancji.



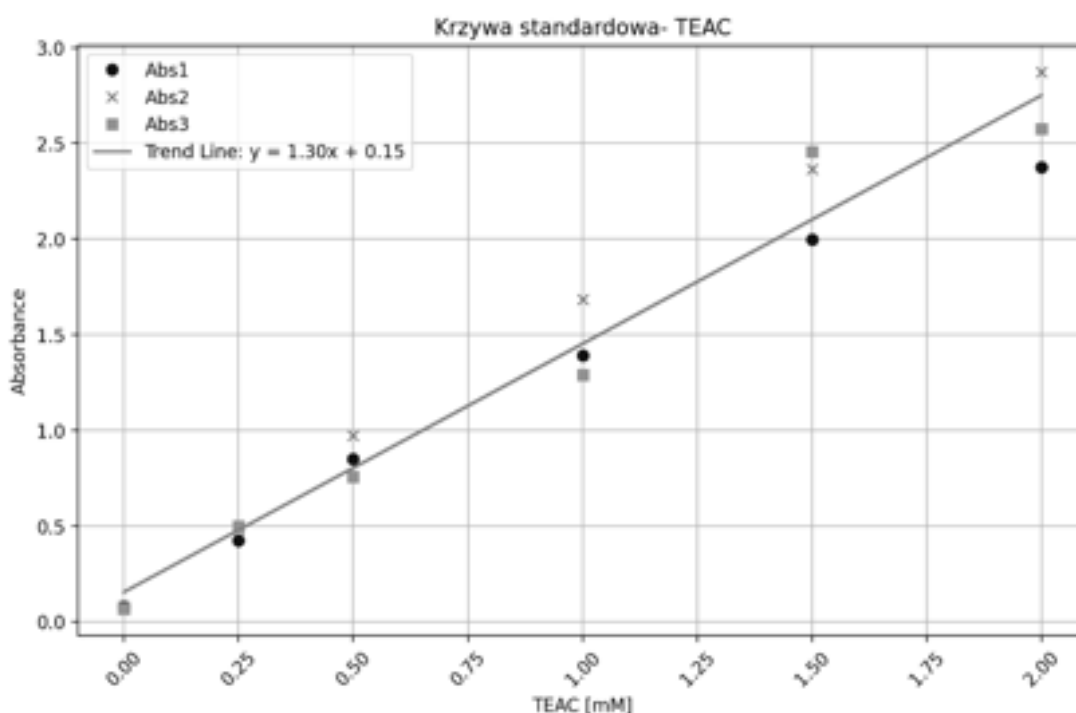
Rysunek 15. Krzywa standardowa zaleźności absorbancji od stężenia witaminy C w teście ABTS



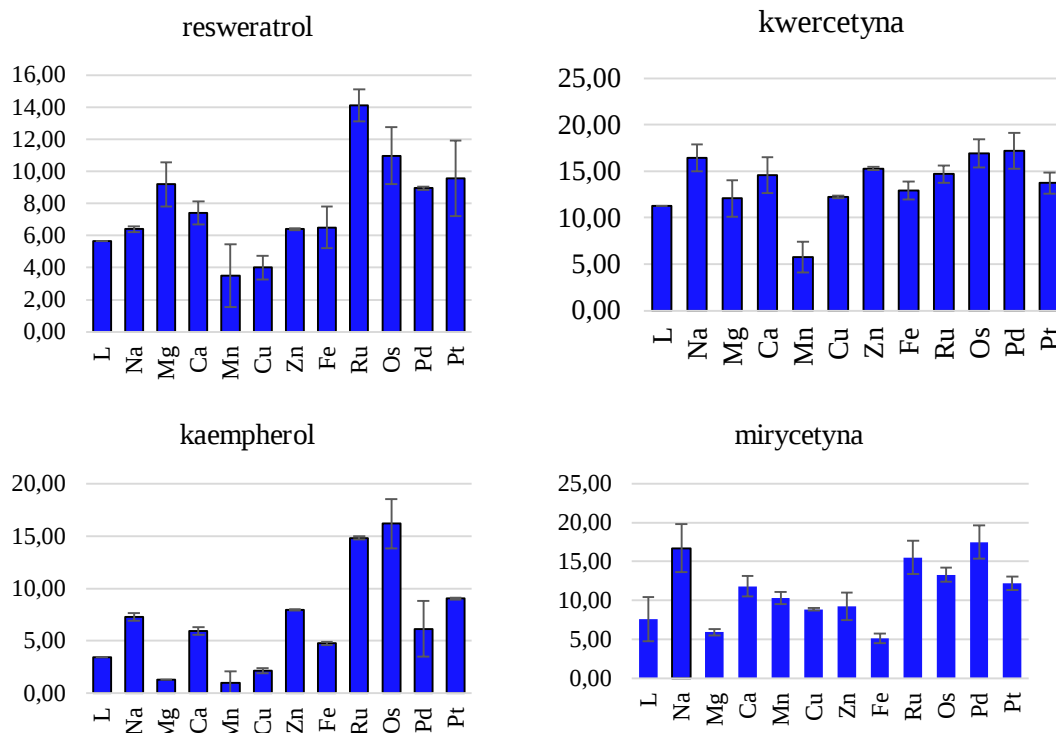
Rysunek 16. Wartości VCEAC [mM] dla ligandów i metalokompleksów wyznaczone metodą ABTS.

7.3.3. Metoda CUPRAC

Na podstawie krzywej standardowej dla Troloxu (Rysunek 17) obliczono wartości TEAC i przedstawiono w formie wykresów (Rysunek 18). Zaobserwowano, że obecność osmu lub rutenu prowadzi do wzrostu właściwości antyoksydacyjnych badanych substancji. Jest to spójne z wcześniejszymi obserwacjami z innych testów. Jednak pomijając wpływ tych dwóch metali, można zaobserwować pewne specyficzne efekty związane z obecnością innych jonów. Sole sodowe potęgowały zdolności redukcyjne wobec jonów miedzi (II). Podejrzewa się, że może to być wynikiem zwiększonej rozpuszczalności tych soli w porównaniu do wolnego ligandu. Oznacza to, że obecność sodu może sprzyjać lepszemu "dostępowi" do jonów miedzi, co przekłada się na efektywniejszą redukcję. W przypadku metalokompleksów magnezu, dla kaempferolu obserwuje się obniżenie właściwości antyoksydacyjnych, podczas gdy dla kwercetyny i mirycetyny magnez nie spowodował znaczących zmian. W przypadku RES, obecność magnezu zwiększała właściwości przeciwutleniające. Jony żelaza, znane z potencjalnie prooksydacyjnych właściwości, nie wpłynęły istotnie na zdolności antyoksydacyjne ligandu. Wynik ten sugeruje, że żelazo nie oddziaływało w sposób konkurencyjny ani wspomagający z ligandami w kontekście reakcji antyoksydacyjnych w teście CUPRAC.

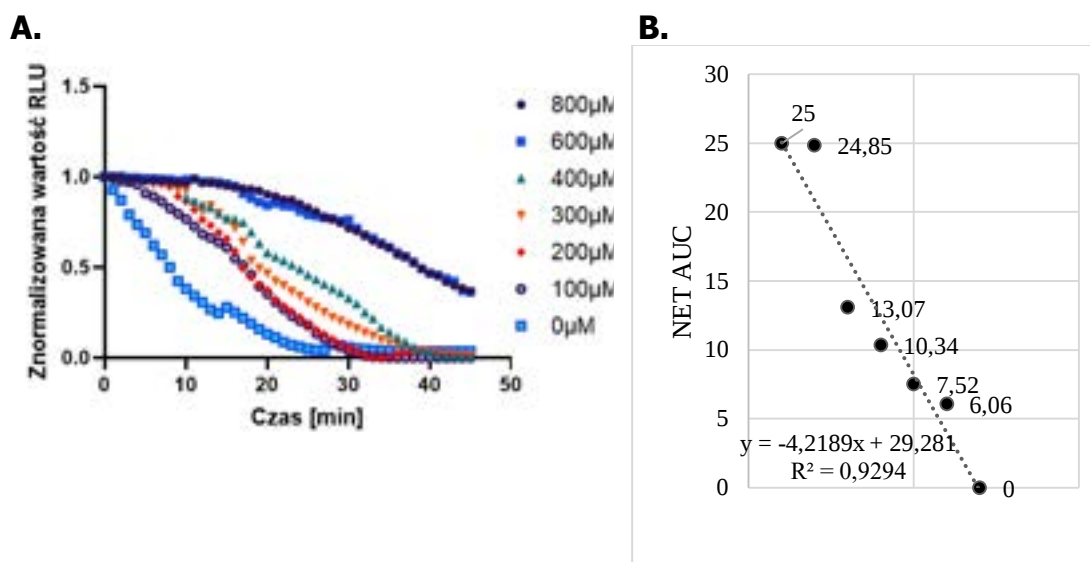


Rysunek 17. Krzywa standardowa absorbancji od wartości TEAC wyznaczona dla Troloxu



Rysunek 18. Wartości TEAC [mM] dla ligandów i metalokompleksów wyznaczone metodą CUPRAC. Na osi Y oznaczono milimolowe stężenie Troloxu, które w identycznych warunkach wykazuje aktywność przeciwutleniającą równoważną 1 M badanej substancji. Wyższe wartości TEAC oznaczają lepsze właściwości antyoksydacyjne.

7.3.4. Metoda HORAC

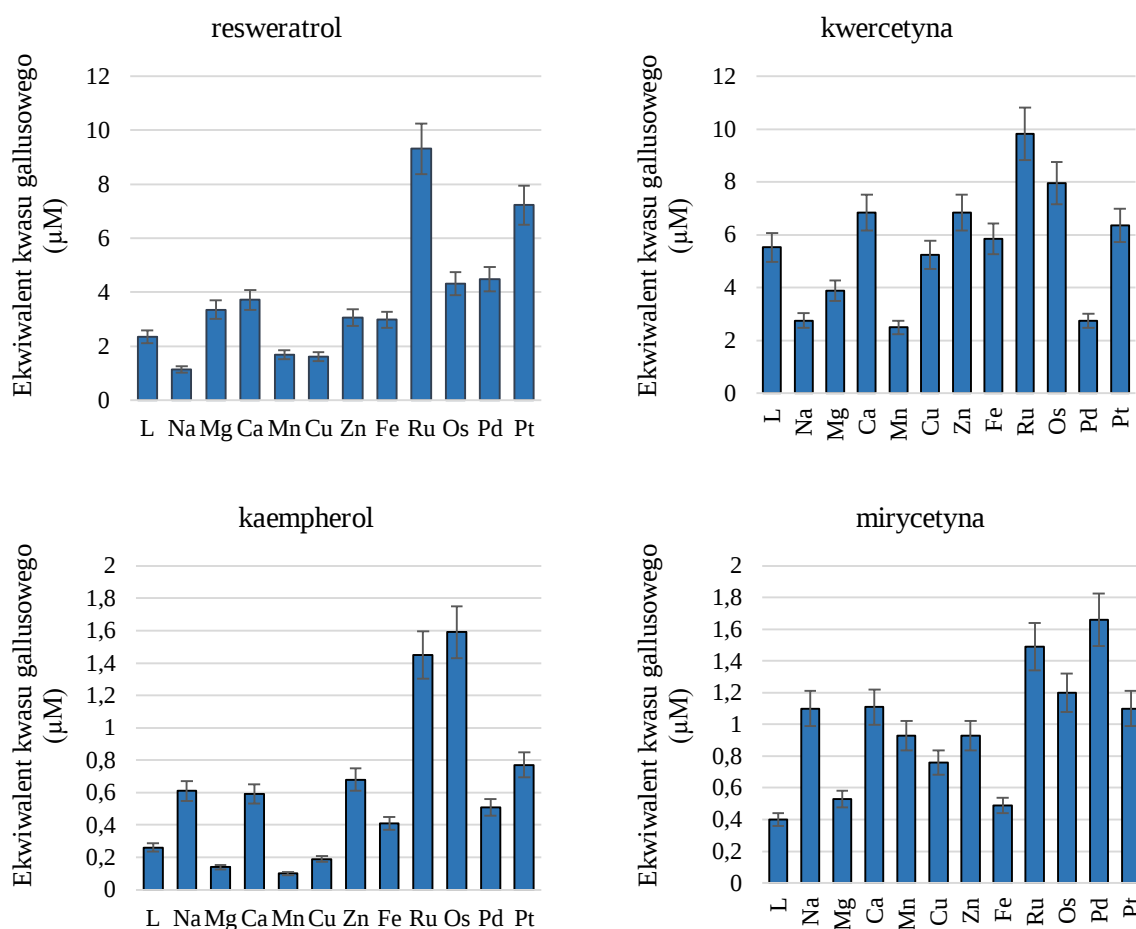


Rysunek 19. Znormalizowana wartość fluorescencji kwasu galusowego i krzywa standardowa kwasu galusowego.

Tabela 13. Wartości AUC i NET AUC (wartość znormalizowana do AUC dla 0 μ M)

	800 μ M	600 μ M	400 μ M	300 μ M	200 μ M	100 μ M	0 μ M
AUC	35,64	35,49	23,71	20,98	18,16	16,70	10,64
NET AUC	25,00	24,85	13,07	10,34	7,52	6,06	-

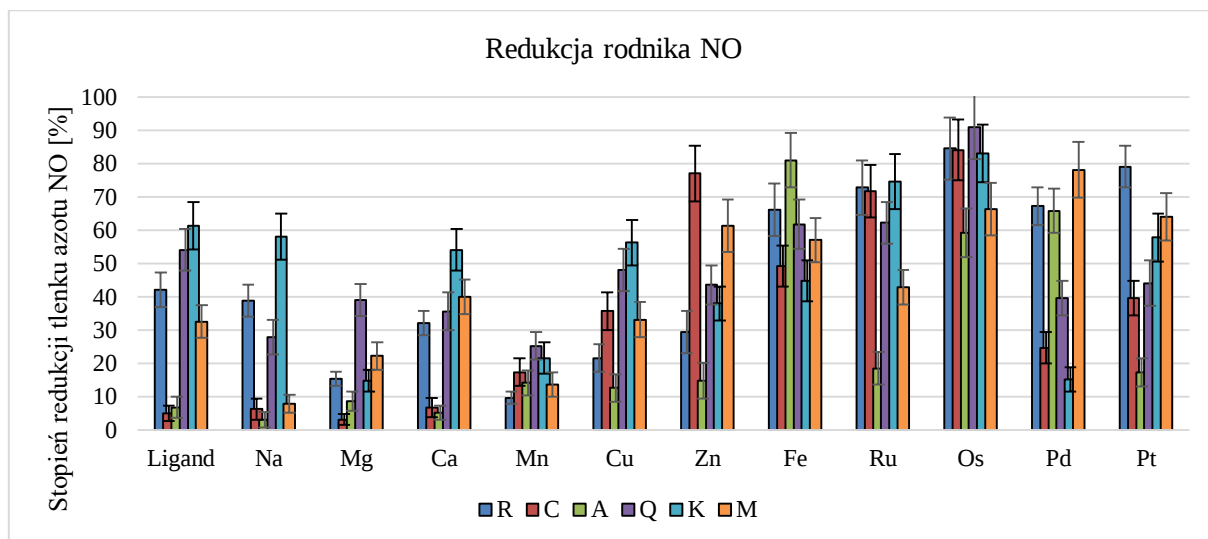
Pojemność antyoksydacyjna próbki koreluje z krzywą zaniku fluorescencji, która jest reprezentowana jako pole pod krzywą (AUC) (Rysunek 19). AUC służy do ilościowego określenia całkowitej aktywności antyoksydacyjnej wolnych rodników hydroksylowych w próbce i jest porównywana z kalibracyjną krzywą antyoksydantu kwasu galusowego (tabela 13).

**Rysunek 20.** Wartości ekwiwalentu kwasu gallusowego (μ M) uzyskane w metodzie HORAC

Kwercetyna wyróżniła się najwyższą wartością do redukcji rodnika nadtlenu wodoru, co wyróżnia ten związek spośród badanych ligandów (Rysunek 20). Należy jednak podkreślić, że w testach opartych na pomiarze fluorescencji ważnym czynnikiem mogącym wpływać na wyniki jest tworzenie się związków nierozpuszczalnych. W takich sytuacjach zmniejszenie sygnału fluorescencyjnego może niekoniecznie odzwierciedlać zdolności antyoksydacyjne związku, ale może być efektem jego wytrącania się z roztworu. W przypadku resweratrolu i kwercetyny sole sodowe obniżyły właściwości antyoksydacyjne,

podczas gdy dla kaempferolu i mirycetyny zwiększyły je. Jest to interesujące, ponieważ te obserwacje są odmienne od wyników uzyskanych w innych testach właściwości antyoksydacyjnych. Może to sugerować, że warunkowane jest to innym mechanizmem redukcji rodnika w poszczególnych testach przez badane związki.

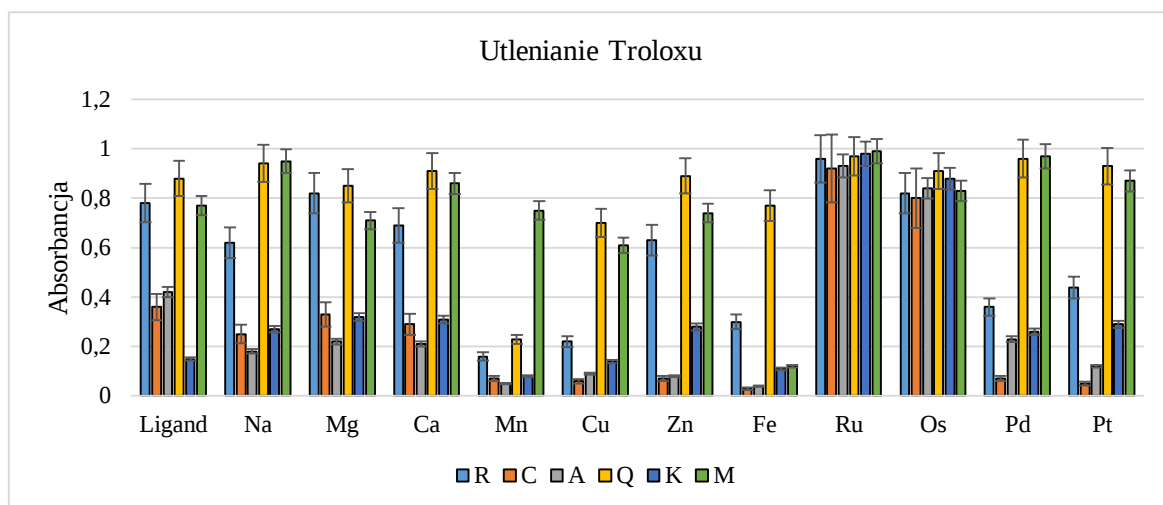
7.3.5. Redukcja rodnika tlenu azotu



Rysunek 21. Stopień redukcji rodnika NO^{*} w badanych próbkach roztworów ligandów i metalokompleksów. (legenda: R-Resweratrol, C-Chryzyna, A-Apigenina, Q- Kwercetyna, M-Mirycetyna)

W metodzie redukcji rodnika tlenu azotu, zarówno chryzyna jak i apigenina nie wykazywały widocznych zdolności antyoksydacyjnych. Co interesujące, obserwuje się pewną tendencję związaną z obecnością soli sodowych i wapniowych w kontekście zdolności kaempferolu do redukcji rodnika NO. Zarówno sole sodowe, jak i wapniowe zwiększały aktywność antyoksydacyjną tego flawonoidu. Natomiast kompleksy z manganem prezentowały się znacząco gorzej. Wszystkie z nich były mało aktywne wobec rodnika NO i w każdym przypadku obniżały zdolność do jego redukcji (Rysunek 21). To potwierdza tendencję obserwowaną również w innych testach, gdzie metalokompleksy z manganem były mniej skuteczne w neutralizacji wolnych rodników w porównaniu z ich pierwotnymi ligandami.

7.3.6. Prooksydacyjne utlenianie Troloxu



Rysunek 22. Wartości absorbancji przy ($\lambda = 272$ nm) w badanych próbkach roztworów ligandów i metalokompleksów. (legenda: R-Resweratrol, C-Chryzyna, A-Apigenina, Q-Kwercetyna, M-Mirycetyna)

Właściwości prooksydacyjne powinny być interpretowane inaczej niż właściwości antyoksydacyjne, chociaż można zauważyć pewne zależności, zwłaszcza w kontekście liczby grup hydroksylowych w moleku. Grupy hydroksylowe są aktywnymi miejscami, które mogą uczestniczyć w reakcjach redoks, a ich liczba i położenie w strukturze cząsteczki mogą wpływać zarówno na właściwości antyoksydacyjne, jak i prooksydacyjne związku. We wszystkich analizowanych przypadkach, najwyższe właściwości prooksydacyjne wykazywały resweratrol i mirycetyna, które charakteryzują się największą liczbą grup OH. Następnie plasuje się kwercetyna oraz jej metalokompleksy, które również wykazują silne właściwości prooksydacyjne (Rysunek 22). To potwierdza teorię o związku między liczbą grup hydroksylowych a właściwościami prooksydacyjnymi. Co więcej, mirycetyna, posiadając najwięcej grup hydroksylowych wśród analizowanych związków, wykazuje silne właściwości prooksydacyjne zarówno w postaci czystego ligandu, jak i w postaci metalokompleksu. To sugeruje, że obecność tych grup w strukturze molekularnej odgrywa kluczową rolę w determinowaniu właściwości redoks związku.

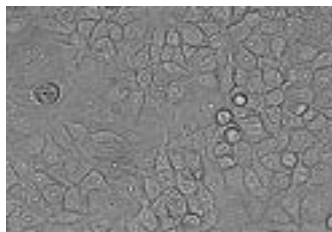
7.4. Właściwości cytotoksyczne

7.4.1. Właściwości cytotoksyczne ligandów

Resweratrol wykazał umiarkowaną toksyczność wobec komórek MCF-7, przy czym najwyższe stężenie (200 μM) skutkowało znacznym obniżeniem przeżywalności do 54,69% ($\pm 2,07$). Co interesujące, wraz ze spadkiem stężenia resweratrolu, przeżywalność komórek wzrastała, osiągając wartość 88,54% ($\pm 1,88$) przy najniższym stężeniu 12,5 μM . To sugeruje, że resweratrol może mieć działanie hormetyczne, gdzie niższe stężenia mogą wywoływać odpowiedź ochronną w komórkach nowotworowych. Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku komórek MDA-MB-231, gdzie resweratrol w najwyższym stężeniu zmniejszał przeżywalność do 63,70% ($\pm 7,55$), ale przy najniższym stężeniu (12,5 μM) przeżywalność wzrosła do 110,92% ($\pm 11,64$). Może to wskazywać na zróżnicowane działanie resweratrolu w zależności od linii komórkowej. Apigenina, z kolei, wykazała znacznie silniejszą toksyczność, szczególnie wobec komórek MCF-7, gdzie przy stężeniu 200 μM przeżywalność spadła do 34,71% ($\pm 4,35$) (Rysunek 24). Przy niższych stężeniach (12,5 μM) zaobserwowano pewien wzrost przeżywalności do poziomu 109,09% ($\pm 4,55$), co może sugerować niewielką aktywność proliferacyjną przy niższych dawkach (Rysunek 23). W przypadku komórek MDA-MB-231 apigenina była równie toksyczna, obniżając przeżywalność przy stężeniu 200 μM do 25,69% ($\pm 6,10$), a przy najniższym stężeniu (12,5 μM) powodując wzrost przeżywalności do 123,17% ($\pm 11,11$). Te wyniki wskazują na silne właściwości antyproliferacyjne apigeniny, szczególnie w wyższych stężeniach, co czyni ją potencjalnie efektywnym inhibitorem wzrostu nowotworów. Kempferol również wykazywał toksyczność, przy czym największy efekt obserwowano w komórkach MCF-7, gdzie przy stężeniu 200 μM przeżywalność spadła do 30,95% ($\pm 7,23$). Niższe stężenia kempferolu wykazywały zmniejszoną toksyczność, co może wskazywać na pewien próg stężenia, powyżej którego następuje gwałtowny spadek przeżywalności. W komórkach MDA-MB231 kempferol wydawał się mniej toksyczny (Rysunek 24).

Kwercetyna wykazała złożoną odpowiedź w obu liniach komórkowych. W przypadku MCF-7 najwyższe stężenie (200 μM) zmniejszyło przeżywalność do 55,70% ($\pm 6,76$), jednak niższe stężenia, zwłaszcza 12,5 μM , wyraźnie zwiększały przeżywalność do poziomu 110,92% ($\pm 12,14$). Podobny efekt zaobserwowano w komórkach MDA-MB-231, gdzie najniższe stężenie kwercetyny również podnosiło przeżywalność do 110,92% ($\pm 12,14$). Tego typu odpowiedź może sugerować, że kwercetyna wykazuje działanie hormetyczne, gdzie niskie dawki mogą mieć działanie antyapoptotyczne. Mirycetyna okazała się najbardziej toksyczna wobec komórek MCF-7, szczególnie przy najwyższym stężeniu 200 μM , gdzie przeżywalność spadła do zaledwie 4,76% ($\pm 0,95$), jednak ocena morfologiczna wskazywała na charakter nekrotyczny śmierci komórkowej. W miarę obniżania stężenia obserwowano wzrost przeżywalności, jednak wartości te pozostawały na stosunkowo niskim poziomie. W komórkach MDA-MB-231 mirycetyna również wykazywała silną toksyczność przy najwyższym stężeniu, redukując przeżywalność do 51,28% ($\pm 3,85$), jednak w niższych stężeniach zaobserwowano wzrost przeżywalności, osiągając wartość 126,32% ($\pm 12,63$) przy stężeniu 12,5 μM (Rysunek 24). Resweratrol i kwercetyna mogą mieć potencjalne zastosowanie w specjalistycznym żywieniu

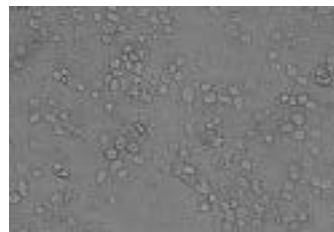
onkologicznym ze względu na ich działanie ochronne w niskich dawkach. Włączenie żywności bogatej w te związki do diety pacjentów onkologicznych może wspierać tradycyjne metody leczenia, a także wpływać na ogólną kondycję zdrowotną pacjentów. Szczególnie interesujące jest działanie hormetyczne, które sugeruje, że odpowiednie dawki tych związków mogą wspierać zdrowie komórek, podczas gdy wyższe dawki mogą wspomagać walkę z chorobą z równoległym stosowaniem tradycyjnych metod terapii.



Kontrola

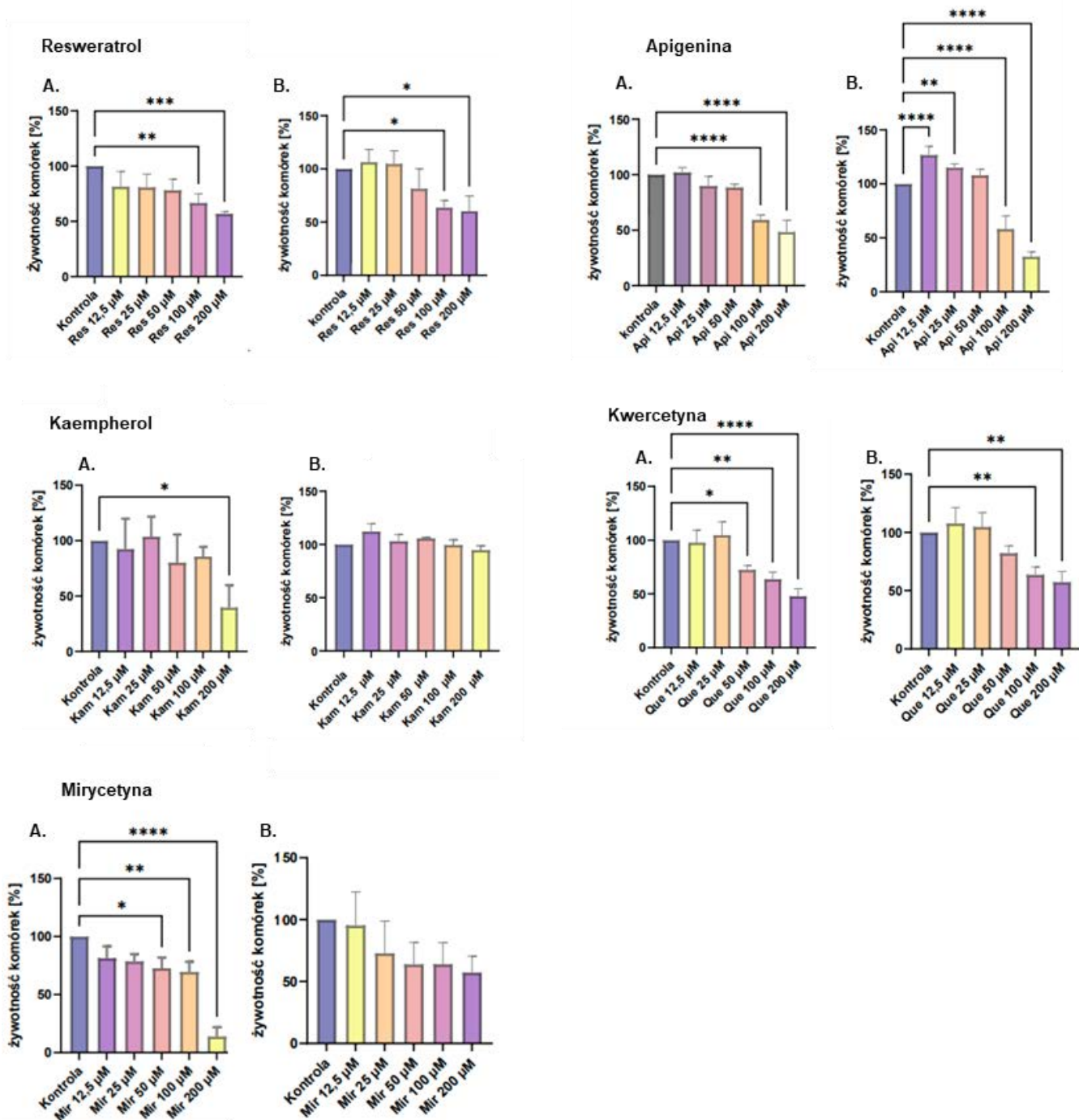


Api 50 µM



Api 200 µM

Rysunek 23. Zmiany morfologiczne komórek linii MCF-7 po 24-godzinnej inkubacji z apigeniną (Api).



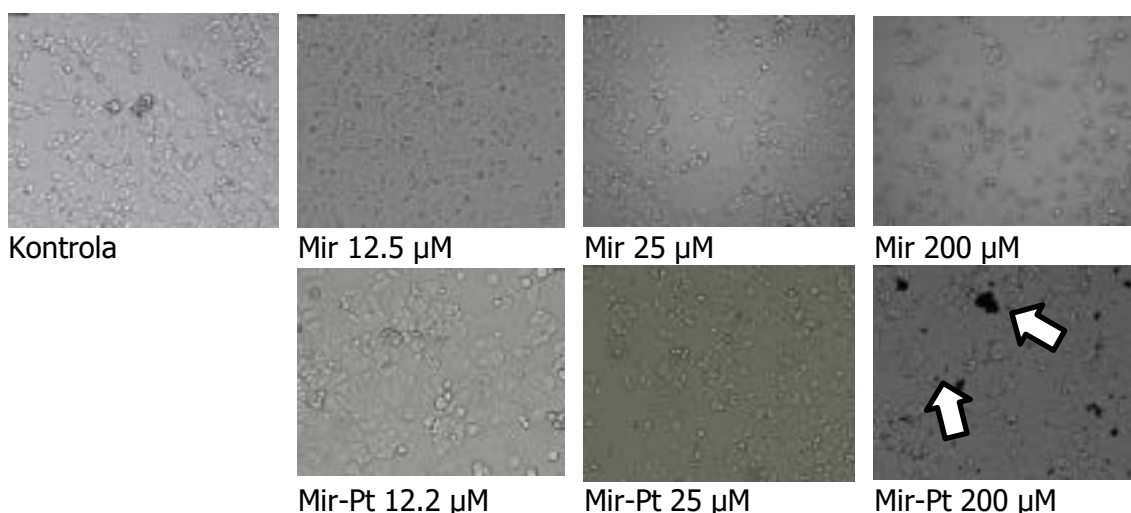
Rysunek 24. Żywotność komórek [%] w odniesieniu do próby kontrolnej po 24h inkubacji z poszczególnymi ligandami na komórkach linii MCF-7 (A) i MDA-MB-231 (B). Kontrola-próba komórek kontrolnych- bez badanego ligandu, <1% DMSO. Wartości $p < 0$, (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,0005$ (****)

7.4.2. Cytotoksyczność ligandu i jego metalokompleksu

Przeprowadzone badania w warunkach *in vitro* sugerują, że wprowadzenie metalu toksycznego, jakim jest platyna, do struktury flawonoidu, może wpłynąć na reaktywność biologiczną tego związku. W szczególności, analizując wpływ MIR i jej metalokompleksu z platyną na komórki, które są wrażliwe na działanie leku i flawonoidów, zaobserwowano zjawisko odmienne od oczekiwanego.

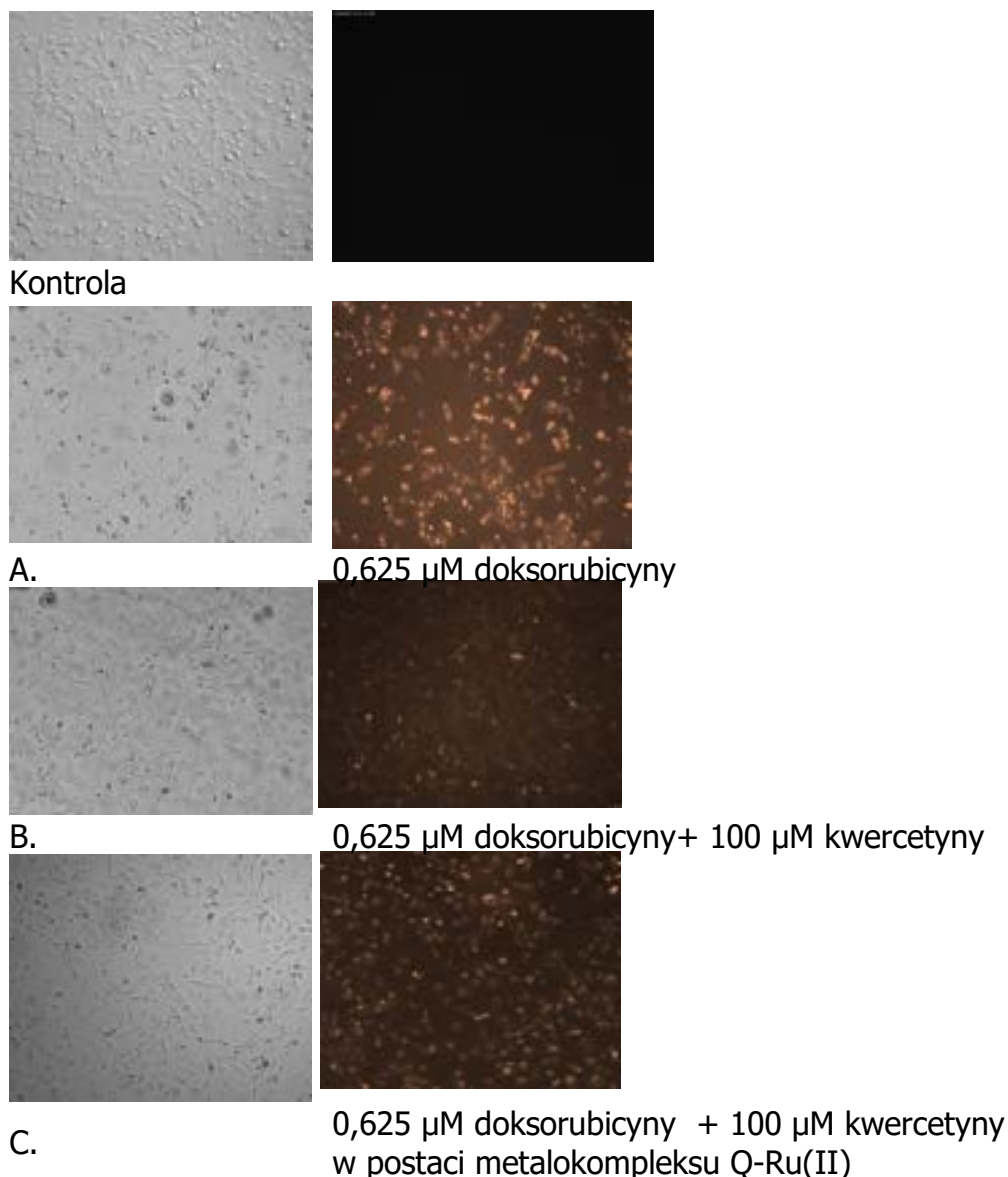
Interesujące jest to, że wyższe stężenie (200 μM) związku metaloorganicznego nie skutkowało toksycznością, lecz raczej sprzyjało wyższej żywotności komórek w porównaniu do działania samej mirycetyny. Obserwacja wytrącania się osadu lub kryształów wokół komórek w obecności metalokompleksu może być przyczyną osłabionej toksyczności.

Dane te sugerują potrzebę dalszych badań w celu zrozumienia mechanizmów, przez które metalokompleks Mirycetyna z platyną może wykazywać inne działanie biologiczne od samego flawonoidu. Możliwe, że interakcje chemiczne i biologiczne związane z obecnością metalu toksycznego w strukturze kompleksu wpływają na aktywność biologiczną i reaktywność tego związku.



Rysunek 25. Komórki linii MCF-7 poddane działaniu MIR lub metalokompleksu MIR z platyną. Widoczne wytrącanie nierozpuszczalnego metalokompleksu z zachowaniem żywych komórek.

W ramach badania wpływu kwercetyny, flawonoidu o potwierdzonych właściwościach antyoksydacyjnych, oraz jej kompleksu z rutenem na komórki linii MDA-MB-231, przeprowadzono szereg eksperymentów. Analiza morfologiczna tych komórek pozwoliła na zbadanie wpływu wymienionych związków na ich strukturę i funkcje.



Rysunek 26. Zdjęcia mikroskopowe komórek linii MDA-MB-231 inkubowanych przez 24h z doksorubicyną osobno (A) lub w połączeniu z kwercetyną w stężeniu 100μM (B) lub kompleksem z rutenem w stężeniu 100 μM w świetle widzialnym i fluorescencyjnym

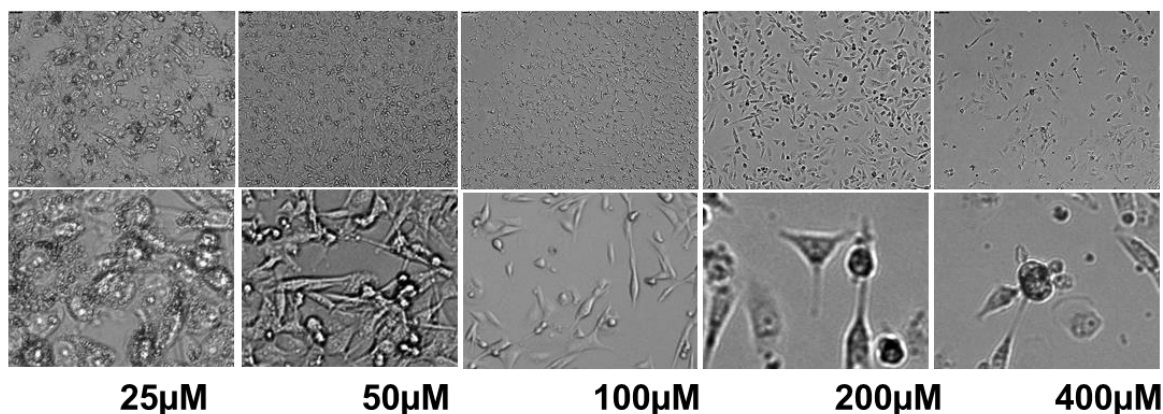
Na rysunku 26 przedstawiono zbiór zdjęć mikroskopowych w świetle widzialnym komórek MDA-MB-231 po 24-godzinnym działaniu kwercetyny, kompleksu kwercetyna-Ru(II), lub ich kombinacji z lekiem cytotoksycznym. Doksorubicyna w wysokim stężeniu- 2,5μM stanowi kontrolę pozytywną, gdzie komórki po dobowej inkubacji są martwe z widocznymi kolistymi strukturami błon komórkowych.

Komórki linii MDA-MB-231 zostały poddane działaniu kwercetyny. Zauważono, że flawonoid ten istotnie moduluje wpływ toksycznego ksenobiotyku na komórki – doksorubicyny, mającej zdolność do penetracji błon komórkowych i powodowania uszkodzeń oksydacyjnych. W obecności kwercetyny, większa liczba komórek wykazuje

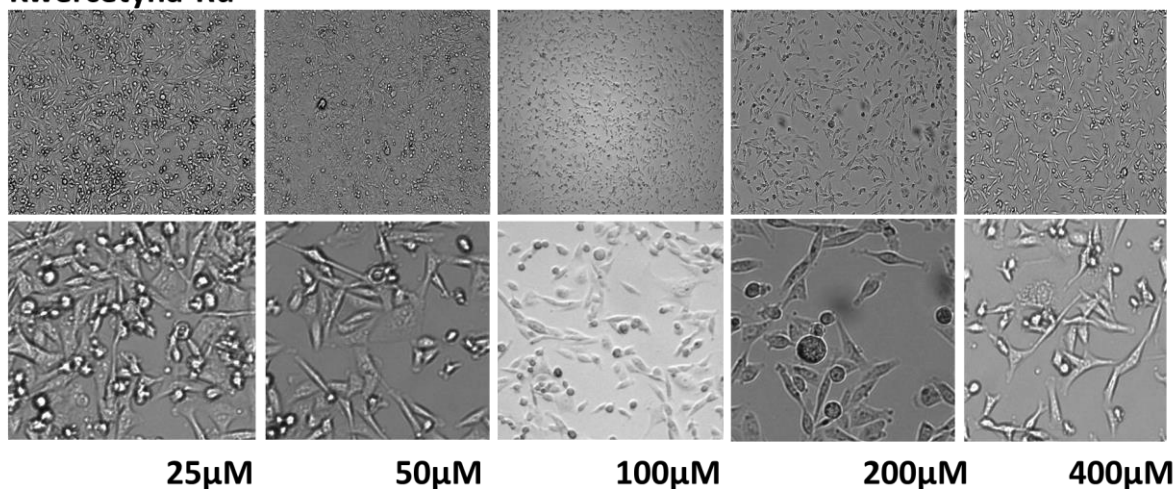
zdolność do przeżycia w porównaniu do próbek traktowanych wyłącznie dokсорubicyną (Rysunek 27). To odkrycie może sugerować potencjał tego flawonoidu w modulowaniu toksyczności popularnego leku przeciwnowotworowego, co może mieć kluczowe znaczenie w kontekście suplementacji i żywienia specjalnego przeznaczenia w trakcie terapii onkologicznej, chroniąc zdrowe tkanki m.in. przewodu pokarmowego i śródbłónka naczyń krwionośnych przed śmiercią komórkową.

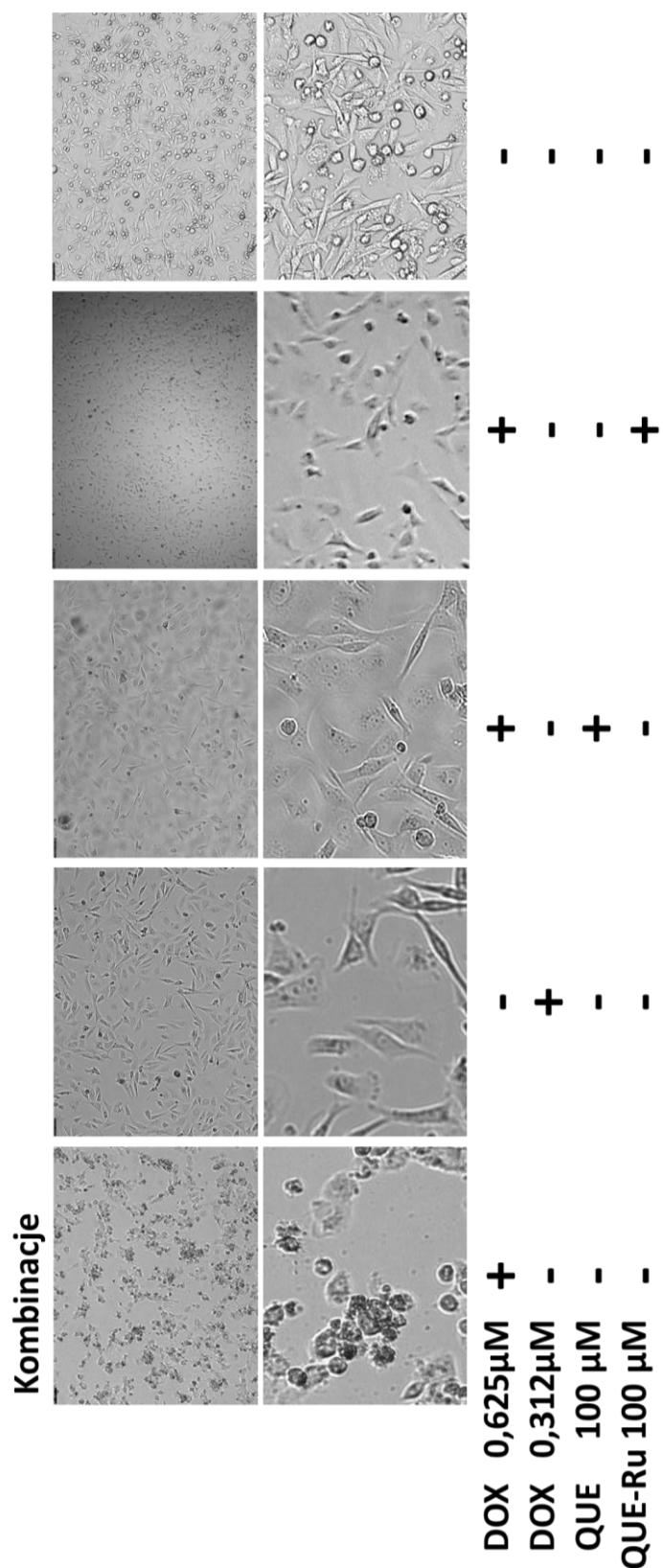
Jednocześnie, badania wykazały, że kompleks kwercetyny z rutenem – metalu o właściwościach toksycznych, prowadzi do zwiększonego odsetka śmierci komórkowej w porównaniu do działania samego ligandu. Może to wskazywać na złożoną interakcję między tymi dwoma związkami i konieczność dalszych badań w celu zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw tego zjawiska. Analiza w świetle fluorescencyjnym ujawniła, że dokсорubicyna w mniejszym stopniu kumuluje się w komórkach w obecności kwercetyny. Wysoka fluorescencja tła świadczy o obecności leku w medium, jednak jej przenikanie i akumulacja w komórkach są utrudnione.

Kwercetyna



Kwercetyna-Ru



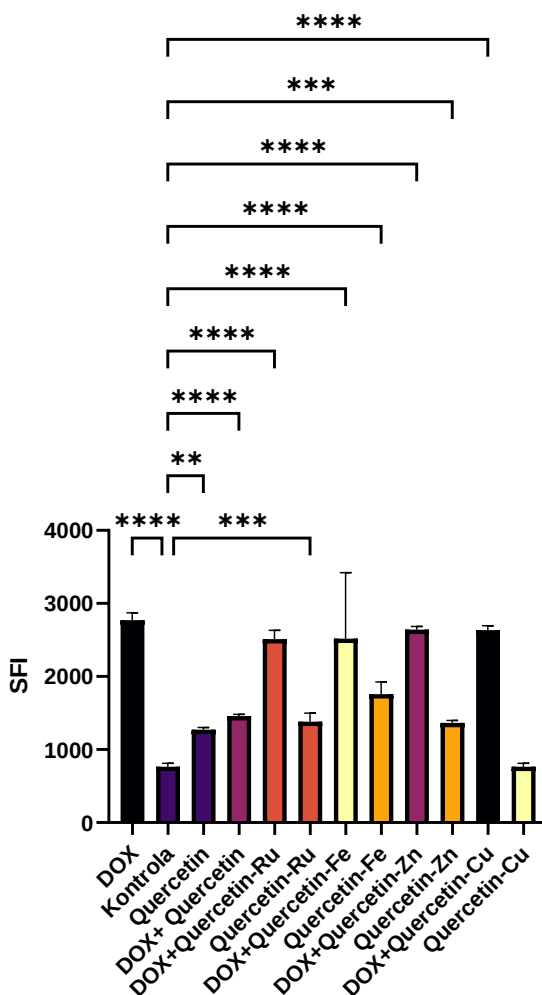


Rysunek 27. Zdjęcia mikroskopowe komórek MDA-MB-231 wykonane w świetle widzialnym po 24-godzinnej inkubacji z ligandem- kwercetyną i jej metalokompleksem z rutenem (QUE-Ru) oraz ich kombinacji z doksorubicyną. .

7.5. Genotoksyczność i zdolność wiązania z DNA

7.5.1. Genotoksyczność in vivo

Wyniki uzyskane dla wszystkich badanych kombinacji zostały przeanalizowane jako wartości Specyficznej Intensywności Fluorescencji (SFI). Żywotność komórek bakteryjnych nie była analizowana osobno, ponieważ stanowiła jedynie wartość odniesienia do normalizacji danych. W analizie tych wyników, na przykładzie kwercetyny jej metalokompleksów oraz dokсорubicyny, zaobserwowano, że wybrane metalokompleksy z Cu(II) i Zn(II) nasilają zdolność do uszkodzenia DNA w porównaniu z samą kwercetyną. W konsekwencji powoduje to wzrost poziomu uszkodzeń DNA do wartości porównywalnych z tymi, które są indukowane przez dokсорubicynę (DOX).

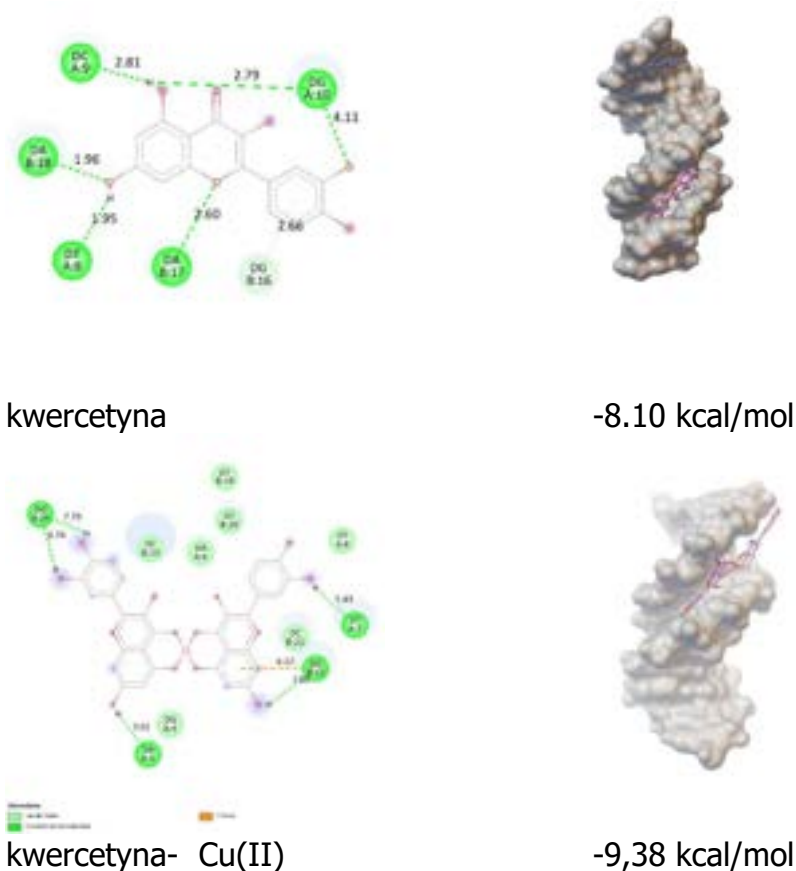


Rysunek 28. Wartości specyficznej intensywności fluorescencji (SFI) po działaniu DOX oraz kwercetyną i wybranymi związkami kompleksowymi z metalami, które zostały zaklasyfikowane do badań toksyczności na podstawie istotnej toksyczności w stężeniu 50µM. . * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, w porównaniu z kontrolą).

W przypadku połączenia metalokompleksu z antracykliną, nie odnotowano dalszego wzrostu wartości SFI w porównaniu z samą doksorubicyną, choć utrzymuje się ona na wyższym poziomie niż w próbie kontrolnej. Wyniki te sugerują, że flawonoid wykazuje działanie ochronne przed uszkodzeniem DNA wywołanym przez doksorubicynę, jednak efekt ten jest neutralizowany przez kompleksowanie z jonami wybranych metali, co nadaje badanym związkom istotnie wyższe właściwości genotoksyczne niż ligandowi w postaci nieskompleksowanej. Pomimo to, żaden z analizowanych związków nie nasilił genotoksyczności wywoływanej przez doksorubicynę, która w dalszym ciągu wykazuje najwyższą zdolność do uszkodzania struktury DNA oraz wywoływania odpowiedzi naprawczej. Flawonoidy mogą więc nabierać właściwości genotoksycznych w obecności jonów metali. Flawonoidy są często promowane jako korzystne dla zdrowia ze względu na swoje właściwości antyoksydacyjne, jednak w obecności metali mogą one paradoksalnie przyczyniać się do uszkodzeń DNA. Oznacza to, że bogata w flawonoidy może nie być jednoznacznie korzystna, zwłaszcza w przypadku osób narażonych na wysokie stężenia jonów metali, na przykład z wody pitnej lub określonych produktów spożywczych. Istnieje ryzyko, że takie interakcje mogą prowadzić do niezamierzonych skutków zdrowotnych.

7.5.2. Modelowanie molekularne

Wyniki uzyskane w badaniach nad interakcjami flawonoidów i ich kompleksów z DNA wykazały, że zarówno ligandy, jak i ich metalokompleksy wykazują zdolność do wiązania się z DNA, przy czym metalokompleksy charakteryzują się wyższą stabilnością wiązania. Przykładowo, wolna energia wiązania kwercetyny z DNA wyniosła -8,10 kcal/mol, natomiast dla jej kompleksu z Cu(II) była ona niższa i wyniosła -9,38 kcal/mol, co sugeruje silniejsze wiązanie kompleksu z DNA. Wskazuje to na potencjalne zwiększenie właściwości genotoksycznych w obecności jonów metali, co może mieć istotne znaczenie w kontekście badań nad genotoksycznością tej grupy związków.

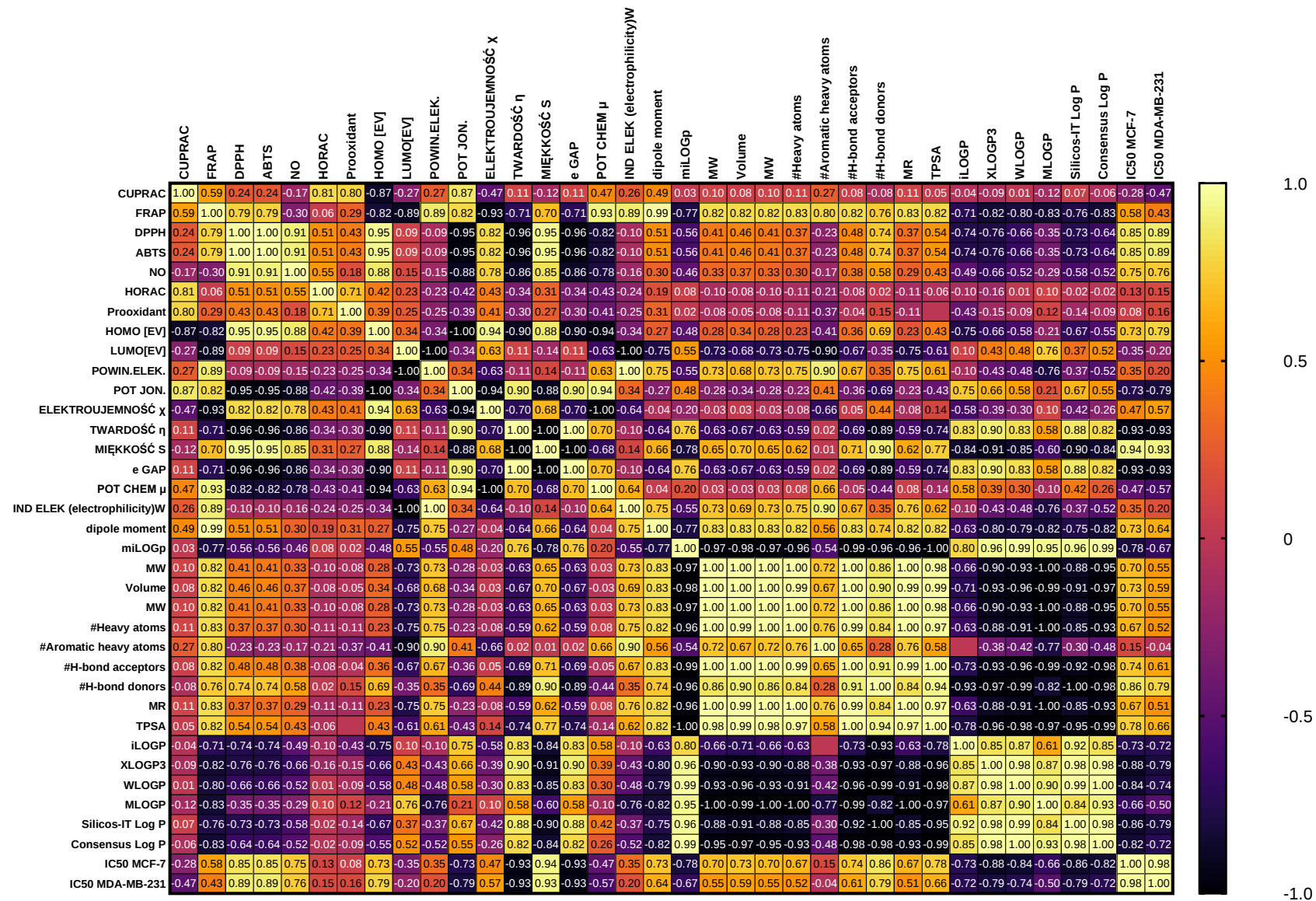


Rysunek 29. Przewidywane miejsce wiązania QUE i metalokompleksu Q-Cu(II) z DNA.

7.6. Struktura związku a ich aktywność biologiczna

Aktywność przeciwutleniająca, zmierzona metodą CUPRAC, wykazuje wyraźną dodatnią zależność z wynikami testów HORAC i Prooxidant. Oznacza to, że wzrost zdolności do neutralizacji wolnych rodników, mierzony tą metodą, koreluje z podobnym wzrostem w pozostałych dwóch testach. Jednocześnie, obserwuje się silną ujemną korelację z wartością energii HOMO, co wskazuje, że zwiększona aktywność przeciwutleniająca może być związana z rozkładem ładunku elektronowego, a konkretnie- z niższą energią orbitali najwyższego zajętego poziomu.

W przypadku metody FRAP, zauważalna jest dodatnia korelacja z momentem dipolowym i wartością potencjału chemicznego. Na przeciwnym biegunie znajduje się zależność między FRAP a energią HOMO oraz elektroujemnością- w miarę spadku wartości tych dwóch parametrów, aktywność przeciwutleniająca rośnie. DPPH i ABTS, jako najpopularniejsze testy aktywności przeciwutleniającej, wykazują zbieżność w swoich profilach korelacyjnych. Są one dodatnio skorelowane ze zdolnością do neutralizacji rodnika tlenu azotu. Ujemna korelacja z twardością chemiczną i wartością eGAP wskazuje, że wzrost aktywności przeciwutleniającej mierzony tymi metodami, jest związany ze spadkiem twardości oraz różnicy energii między orbitalami LUMO i HOMO.



Warto wspomnieć o wskaźnikach miLOGp, MW, Volume, liczby akceptorów i donorów protonów, które wykazują silną korelację. Wskazuje to na ich związek z rozmiarem i złożonością molekularną substancji, co odzwierciedla zwiększoną złożoność i rozmiar molekularny badanych związków:

Kluczowe elementy strukturalne i ich rola w aktywności antyoksydacyjnej to między innymi:

- Struktury orto-dihydroksy w pierścieniu B zapewnia stabilność flawonoidowych rodników fenoksyloowych poprzez rozszerzoną delokalizację elektronów i/lub zdolność do tworzenia wiązań wodorowych.
- Podwójne wiązanie C2=C3 w sprzężeniu z Funkcją 4-oxo w pierścieniu C: Prowadzi to do współpłaszczyznowości heteropierścienia i przyczynia się do delokalizacji elektronów we wszystkich trzech pierścieniach aromatycznych, zwiększając w ten sposób stabilność rodnika.
- Brak wyżej wspomnianych cech strukturalnych: ogranicza potencjał antyoksydacyjny flawonoidów.
- Grupy hydroksylowe w pozycjach 3 i 5 w pierścieniach A i C: zapewniają wiązanie wodorowe z grupą oxo, zwiększając aktywność, jako dezaktywator rodników.
- Na podstawie analizy korelacji można stwierdzić również, że związki, które są bardziej lipofilowe i mają niższe powinowactwo elektronowe, wykazują wyższą toksyczność (niższe wartości IC50). Związki o silnych właściwościach antyoksydacyjnych są mniej toksyczne (wyższe wartości IC50).

8. Podsumowanie

8.1. Dyskusja wyników

Wyniki przeprowadzonych badań flawonoidów, takich jak resweratrol, kaemferol, kwercetyna, chryzyna, apigenina i mirycetyna, dostarczają cennych informacji na temat ich właściwości chemicznych, bioaktywności oraz potencjalnych zastosowań w żywieniu funkcjonalnym i farmakologii. Wyniki te mają kluczowe znaczenie w kontekście oceny potencjału tych związków jako antyoksydantów oraz ich wpływu na różne procesy biologiczne, w tym cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych i interakcje z DNA.

Obliczenia kwantowo-mechaniczne dostarczają kluczowych danych na temat energii orbitali molekularnych HOMO (highest occupied molecular orbital) i LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) oraz przerwy energetycznej (eGAP), które są istotnymi wskaźnikami reaktywności chemicznej związków. Kwercetyna i kaemferol, które charakteryzują się najniższymi wartościami eGAP (odpowiednio 3,69 eV i 3,81 eV), wykazały największą reaktywność, co sugeruje ich potencjalne działanie w reakcjach redoks. Wynika to z łatwości, z jaką mogą przekazywać elektrony, co może zwiększać ich potencjał antyoksydacyjny, ale także potencjalnie prowadzić do interakcji o charakterze toksycznym, zwłaszcza przy nadmiernej ekspozycji na te związki.

Niższe wartości eGAP dla kwercetyny i kaemferolu wskazują na ich większą zdolność do udziału w reakcjach z wolnymi rodnikami oraz z makrocząsteczkami biologicznymi, takimi jak białka czy kwasy nukleinowe. Wysoka reaktywność tych flawonoidów może również tłumaczyć ich zdolność do neutralizacji stresu oksydacyjnego, co jest jednym z głównych mechanizmów ochronnych w organizmie przed szkodliwymi skutkami wolnych rodników. Wysokie wartości energii HOMO w przypadku resweratrolu (-5,61 eV) oraz chryzyny (-6,43 eV) sugerują z kolei niższą podatność tych związków na ataki nukleofilowe, co może wskazywać na ich mniejszą aktywność w reakcjach redoks w porównaniu do kwercetyny czy kaemferolu.

Indeksy elektrofilowości i elektrodonorowości stanowią cenne wskaźniki oceny zdolności flawonoidów do reakcji redoks. Wysokie wartości elektrofilowości mirycetyny oraz kwercetyny (4,13 eV i 3,94 eV) wskazują na ich zwiększoną podatność na interakcje z nukleofilami, co może przekładać się na ich zdolność do tworzenia wiązań z białkami i innymi makrocząsteczkami w organizmie, w tym z DNA. Jest to szczególnie istotne w kontekście ich potencjalnych właściwości prooksydacyjnych, które mogą być korzystne lub szkodliwe, w zależności od stanu fizjologicznego organizmu i poziomu stresu oksydacyjnego.

Zdolność kwercetyny i kaemferolu do oddawania elektronów, potwierdzona niskimi wartościami mocy elektrodonorowej, sugeruje, że te flawonoidy mogą pełnić kluczową rolę jako antyoksydanty, neutralizując wolne rodniki poprzez mechanizmy przenoszenia elektronów. Z drugiej strony, ich większa aktywność redoks może prowadzić do generowania reaktywnych form tlenu (ROS), co w nadmiarze może przyczyniać się do indukcji stresu oksydacyjnego i uszkodzeń komórkowych. W kontekście zastosowań terapeutycznych, flawonoidy te mogą wykazywać działanie ochronne w komórkach narażonych na stres

oksydacyjny, co może mieć znaczenie w prewencji chorób związanych z procesami starzenia i nowotworami.

Wyniki dotyczące biodostępności flawonoidów wykazują wyraźne różnice między poszczególnymi związkami. Chryzyna, jako jedyny flawonoid w badanej serii, wykazała wartości parametrów TPSA i WLOGP umożliwiające jej penetrację przez barierę krew-mózg. Jest to szczególnie istotne w kontekście potencjalnych zastosowań neuroprotektoryjnych, gdzie flawonoidy o wysokiej biodostępności mogą chronić komórki nerwowe przed stresem oksydacyjnym. Resweratrol i kaemferol, które mają umiarkowaną biodostępność w przewodzie pokarmowym, mogą być z powodzeniem włączane do diety jako suplementy wspierające zdrowie układu krążenia i zmniejszające ryzyko chorób nowotworowych.

Warto jednak podkreślić, że flawonoidy o większej liczbie grup hydroksylowych, takie jak mirycetyna, wykazują ograniczoną biodostępność ze względu na ich bardziej polarne właściwości, co utrudnia ich przenikanie przez błony biologiczne. W tym kontekście, choć flawonoidy takie jak mirycetyna wykazują wysoką aktywność biologiczną *in vitro*, ich potencjalne korzyści zdrowotne mogą być ograniczone przez słabą biodostępność w organizmie. Włączenie flawonoidów o wyższej lipofilowości, takich jak chryzyna czy resweratrol, może zapewnić lepszą biodostępność, co jest istotne przy projektowaniu suplementów diety. Badania wykazały, że flawonoidy o większej liczbie grup hydroksylowych, takie jak kwercetyna i kaemferol, mają najwyższą zdolność do neutralizacji wolnych rodników, co potwierdzają wyniki testów DPPH, ABTS oraz CUPRAC. Grupy orto-dihydroksylowe w pierścieniu B odgrywają kluczową rolę w stabilizacji rodników fenoksyloowych, co tłumaczy wyższą aktywność antyoksydacyjną tych związków. Z kolei flawonoidy o niższej liczbie grup hydroksylowych, takie jak chryzyna, wykazują mniejszą zdolność do neutralizacji wolnych rodników, co sugeruje, że ich mechanizmy działania mogą opierać się na innych procesach biologicznych, takich jak modulacja szlaków sygnałowych związanych z apoptozą.

Ciekawym aspektem jest wpływ metalokompleksów na właściwości antyoksydacyjne flawonoidów. Kompleksy z rutenem i osmem, które wykazały szczególnie wysoką zdolność do redukcji syntetycznego rodnika DPPH, mogą mieć potencjał do zastosowania jako związki redoks o znaczących właściwościach terapeutycznych. Jednak wyniki sugerują, że te efekty mogą być spowodowane nie tyle przez same flawonoidy, co przez interakcje metali z reagentami używanymi w testach. Jest to istotne, ponieważ wskazuje na konieczność ostrożności w interpretacji wyników antyoksydacyjnych uzyskiwanych dla metalokompleksów.

Wyniki dotyczące cytotoksyczności flawonoidów wobec linii komórkowych MCF-7 i MDA-MB-231 potwierdzają, że flawonoidy, takie jak apigenina, mirycetyna i kwercetyna, mają silne działanie antyproliferacyjne, zwłaszcza przy wyższych stężeniach. Apigenina wykazała największą toksyczność wobec komórek MCF-7, zmniejszając ich przeżywalność do 34,71% przy stężeniu 200 μM , co potwierdza jej potencjalne zastosowanie jako adiuwant w terapii przeciwnowotworowej.

Działanie hormetyczne resweratrolu i kwercetyny jest szczególnie interesujące z perspektywy zastosowań terapeutycznych, gdzie niskie dawki tych związków mogą stymulować mechanizmy obronne komórek, podczas gdy wyższe dawki wywołują apoptozę komórek nowotworowych. Zjawisko to może być kluczowe w projektowaniu terapii opartych

na flawonoidach, zwłaszcza w kontekście ich zastosowania w chemioprewencji i terapii wspomagającej.

Wyniki badań nad interakcjami flawonoidów z DNA wskazują, że zarówno wolne ligandy, jak i ich metalokompleksy, mają zdolność do wiązania się z kwasami nukleinowymi, przy czym metalokompleksy wykazują wyższą stabilność wiązania. Przykładowo, kompleks kwercetyny z Cu(II) wykazał silniejsze wiązanie z DNA (energia wiązania $-9,38$ kcal/mol) w porównaniu do samej kwercetyny ($-8,10$ kcal/mol), co może tłumaczyć zwiększoną genotoksyczność w obecności metali. Wyniki te sugerują, że flawonoidy mogą działać ochronnie wobec uszkodzeń DNA wywołanych przez substancje toksyczne, jednak w obecności jonów metali ich genotoksyczność może wzrastać.

8.2. Weryfikacja hipotez badawczych

HIPOTEZA 1

Istnieje bezpośrednia korelacja między strukturą chemiczną flawonoidów a ich zdolnością do modulowania aktywności biologicznej, w tym działania antyoksydacyjnego oraz wpływu na procesy komórkowe związane z nowotworzeniem.

Badania potwierdzają tę hipotezę, wykazując ścisły związek między strukturą flawonoidów a ich właściwościami biologicznymi. Flawonoidy o większej liczbie grup hydroksylowych, takie jak kwercetyna i kaemferol, wykazały wyższą aktywność antyoksydacyjną, co jest bezpośrednio związane z ich zdolnością do oddawania elektronów i stabilizowania rodników. Struktury orto-dihydroksylowe w pierścieniu B zapewniają stabilność rodników fenoksyloowych, co potwierdza tezę, że specyficzna budowa chemiczna flawonoidów wpływa na ich zdolności antyoksydacyjne.

Ponadto, flawonoidy takie jak apigenina i mirycetyna wykazały silne właściwości cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych, co jest związane z ich zdolnością do indukowania apoptozy i hamowania wzrostu komórek nowotworowych. Zjawisko hormetyczne resweratrolu i kwercetyny, polegające na stymulowaniu odpowiedzi ochronnej przy niskich stężeniach i wywoływaniu apoptozy przy wyższych dawkach, również podkreśla korelację między strukturą flawonoidów a ich wpływem na procesy komórkowe związane z nowotworzeniem.

Weryfikacja: Hipoteza 1 została **potwierdzona**. Istnieje bezpośredni związek między strukturą chemiczną flawonoidów a ich aktywnością biologiczną, w tym działaniem antyoksydacyjnym i cytotoksycznym wobec komórek nowotworowych.

HIPOTEZA 2

Kompleksowanie flawonoidów z jonami metali prowadzi do zmian w ich biodostępności i aktywności biologicznej, co może wpłynąć na ich skuteczność jako składników żywności funkcjonalnej oraz ich potencjalne zastosowanie w terapii onkologicznej.

Wyniki badań potwierdzają, że kompleksowanie flawonoidów z jonami metali zmienia ich właściwości biologiczne. Kompleksy flawonoidów z rutenem, osmem, magnezem czy sodem wykazały zróżnicowane działanie w testach antyoksydacyjnych i cytotoksycznych. Kompleksy z rutenem i osmem znacząco poprawiły zdolności redukcyjne w testach DPPH i ABTS, co może sugerować ich zwiększoną aktywność antyoksydacyjną. Jednocześnie wyniki te wskazują, że obecność wolnych jonów metali w roztworach może prowadzić do artefaktów, a nie rzeczywistego wzrostu aktywności biologicznej flawonoidów.

Kompleksy flawonoidów z metalami, takimi jak Cu(II), wykazały silniejsze wiązanie z DNA, co może prowadzić do zwiększenia genotoksyczności, co może mieć wpływ na ich zastosowanie w terapii onkologicznej. Obecność jonów metali zmienia także biodostępność flawonoidów — związki takie jak kwercetyna w połączeniu z jonami metali wykazały zmniejszoną zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg.

Weryfikacja: Hipoteza 2 została **częściowo potwierdzona**. Kompleksowanie flawonoidów z jonami metali prowadzi do zmian w ich aktywności biologicznej, co może wpływać na ich zastosowanie terapeutyczne, jednak wpływ na biodostępność jest zróżnicowany i wymaga dalszych badań, szczególnie w kontekście potencjalnych artefaktów w testach biologicznych.

HIPOTEZA 3

Modyfikacja strukturalna flawonoidów, poprzez tworzenie kompleksów z metalami, może prowadzić do poprawy ich zdolności do synergistycznego działania z lekami przeciwnowotworowymi, takimi jak doksorubicyna, co może przyczynić się do opracowania bardziej efektywnych strategii żywieniowych wspierających terapię onkologiczną.

Wyniki wskazują na:

- istotną poprawę właściwości antyoksydacyjnych flawonoidów po ich kompleksowaniu z jonami metali, szczególnie w przypadku kompleksów z kwercetyną, mirycetyną i kaempferolem, co sugeruje potencjał synergistyczny w ochronie komórek zdrowych przed uszkodzeniami wywołanymi leczeniem przeciwnowotworowym.
- zwiększoną aktywność biologiczną wybranych kompleksów flawonoidów z metalami w połączeniu z doksorubicyną w porównaniu do flawonoidów w formie niezwiązanej (ligandów). Szczególnie kompleksy zawierające jony cynku (Zn) oraz miedzi (Cu) wykazały zdolność do synergistycznego działania z doksorubicyną, prowadząc do obniżenia niezbędnej efektywnej dawki tego leku, co może przyczyniać się do zmniejszenia działań niepożądanych terapii.
- Jednak nie wszystkie kompleksy flawonoidów wykazywały równie silne efekty synergistyczne, co wskazuje, że istotne znaczenie mają struktura flawonoidu. Najlepsze wyniki odnotowano w kompleksach flawonoidów o strukturze z licznymi grupami hydroksylowymi (zwłaszcza kwercetyna i mirycetyna).

Weryfikacja: Na podstawie przeprowadzonych badań **hipoteza nr 3 została częściowo potwierdzona**. Uzyskane dane wskazują, że strukturalna modyfikacja flawonoidów poprzez tworzenie kompleksów metalicznych może faktycznie przyczyniać się do ich synergistycznego działania z lekami przeciwnowotworowymi, takimi jak doksorubicyna, co jest zgodne z postawioną hipotezą. Wyniki te stanowią podstawę do dalszych badań ukierunkowanych na opracowanie skutecznych strategii żywieniowych wspierających terapię onkologiczną poprzez dobór odpowiednich kompleksów flawonoid-metal.

9. Wnioski

ISTNIEJE ZWIĄZEK MIĘDZY STRUKTURĄ CHEMICZNĄ FLAWONOIDÓW A ICH AKTYWNOŚCIĄ BIOLOGICZNĄ

Związki flawonoidowe o wyższej liczbie grup hydroksylowych, jak kwercetyna i kaempferol, wykazują wyższą aktywność antyoksydacyjną oraz cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych. Struktury takie jak orto-dihydroksylowe w pierścieniu B oraz sprzężenie podwójnego wiązania C2=C3 z grupą 4-oxo w pierścieniu C są kluczowe dla zwiększenia ich aktywności redoks i stabilizacji rodników, co potwierdza ich potencjał jako związków bioaktywnych w prewencji chorób związanych ze stresem oksydacyjnym.

JONY METALI W ISTOTNY SPOSÓB WPŁYWAJĄ NA AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNĄ FLAWONOIDÓW:

Kompleksowanie flawonoidów z jonami metali, takimi jak ruten, osm czy miedź, znacząco modyfikuje ich właściwości biologiczne, w tym zdolność do interakcji z DNA oraz aktywność antyoksydacyjną. Kompleksy z rutenem i osmem zwiększały zdolności redukcyjne flawonoidów, podczas gdy kompleksy z Cu(II) wykazały silniejsze wiązanie z DNA, co sugeruje, że metale mogą potencjalnie zwiększać genotoksyczność flawonoidów. Zmiany te mogą wpływać na ich skuteczność i bezpieczeństwo w kontekście terapii przeciwnowotworowej.

MOŻLIWE JEST POTENCJALNE WYKORZYSTANIE FLAWONOIDÓW W ŻYWIENIU FUNKCJONALNYM

Istnieją solidne podstawy do wykorzystania flawonoidów o dobrej biodostępności, takich jak resweratrol i chryzyna, w żywieniu funkcjonalnym, szczególnie w kontekście ich neuroprotektynowego i antyoksydacyjnego działania. Flawonoidy te, dzięki wyższej lipofilowości, mogą przenikać przez barierę krew-mózg i są skuteczniej wchłaniane z przewodu pokarmowego. Natomiast flawonoidy o bardziej polarnej strukturze, jak mirycetyna, mimo wysokiej aktywności antyoksydacyjnej, mają ograniczoną biodostępność, co może zmniejszać ich efektywność w zastosowaniach klinicznych.

Bibliografia

- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., & Takada, Y.** (2004). *Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies*. *Anticancer Research*, 24(5A), 2783–2840.
- Al-Janabi, S. M. H., Al-Kalifawi, E. J., Alsaadi, A. K., & Jasim, A. M.** (2020). Phenolic compounds: classification and chemistry. *Plant Archives*, 20(2), 4029–4037.
- Baloghova, J., Kovac, J., Schmidt, S., & Urban, L.** (2023). Phenolic compounds from spices in cancer therapy and prevention. *Nutrients*, 15(2), 350.
- Batra, P., & Sharma, A. K.** (2013). *Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives*. 3 Biotech, 3(6), 439–459.
- Briguglio, G., Costa, C., Teodoro, M., et al.** (2020). Polyphenols in cancer prevention: New insights (Review). *International Journal of Functional Nutrition*, 1(1), Art. 9.
- Burkard, M., Leupin, M., & Saurer, M.** (2017). Flavonoids and their role in cancer prevention and therapy: Focus on cell cycle regulation. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 17(13), 1173–1185.
- Chen, L., Mo, H., Zhao, L., & Gao, W.** (2007). Antioxidant properties and mechanisms of EGCG–Cu(II) complex. *Biomaterials*, 20(5), 633–640.
- ClinicalTrials.gov Identifier: NCT06005142.** A Clinical Study Investigating the Effects of Eriomin® on Glycemic Control in Prediabetic Patients. Dostępne na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT06005142>
- Đurđević, Đ., Knežević, A., & Savić, V.** (2011). *Synthesis, characterization and cytotoxic activity of new copper(II) complexes with flavonoid ligands*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(8), 3300–3309.
- Đurđević, Đ., Knežević, A., & Savić, V.** (2011). Synthesis, characterization and cytotoxic activity of new copper(II) complexes with flavonoid ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(8), 3300–3309.
- Farzaei, M. H., Bahramsoltani, R., Rahimi, R., & Abbasabadi, Z.** (2019). A systematic review of Eriomin and its potential health benefits. *Phytotherapy Research*, 33(5), 1279–1285.
- Fink, B. N., Steck, S. E., Wolff, M. S., et al.** (2007). Dietary flavonoid intake and breast cancer risk among women on Long Island. *American Journal of Epidemiology*, 165(5), 514–523.
- Ghosh, R., Chakraborty, A., & Chowdhury, A.** (2006). Antioxidative and DNA binding activity of epigallocatechin gallate–Cu(II) complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347(3), 647–652.
- Islas, M. S., Acosta, A., Chao, H., González, J., Gracia-Mora, I., & Ruiz-Azuara, L.** (2015). Naringenin-oxovanadium(IV) complex exhibits enhanced antiproliferative activity through ROS generation and apoptosis induction in cancer cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 153, 237–246.
- Kaushal, G., Rathour, M., Singh, T., Singh, G., & Kaur, P.** (2022). Flavonoids: Therapeutic potential and recent advances in cancer therapy. W: Atta-ur-Rahman (red.), *Studies in Natural Products Chemistry* (tom 73, s. 43–70). Elsevier.
- Kuo, M. L.** (1996). *Antiproliferative potency of structurally distinct flavonoids on human colon cancer cells*. *Cancer Letters*, 110(1-2), 41–48.
- Liu, R. H.** (2004). *Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action*. *The Journal of Nutrition*, 134(12 Suppl), 3479S–3485S.
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C.** (2000). *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673–751.

- Oh, J. K., Sandin, S., Ström, P., Löf, M., Adami, H. O., & Weiderpass, E.** (2015). *Prospective study of breast cancer in relation to coffee, tea and caffeine in Sweden*. *International Journal of Cancer*, 137(8), 1979–1989. doi:10.1002/ijc.29574
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R.** (2016). *Flavonoids: an overview*. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. doi:10.1017/jns.2016.41
- Rossi, M., Negri, E., Talamini, R., et al.** (2007). Flavonoids and the risk of esophageal cancer in Italy. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 16(8), 1621–1625.
- Roy, S., Banerjee, J., & Mukherjee, A.** (2018). *Quercetin-Ru(III) complex: Synthesis, characterization, DNA binding, oxidative DNA cleavage and photo-induced DNA cleavage activity*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178, 84–93.
- Roy, S., Banerjee, J., & Mukherjee, A.** (2018). Quercetin-Ru(III) complex: Synthesis, characterization, DNA binding, oxidative DNA cleavage and photo-induced DNA cleavage activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178, 84–93.
- Selvakumar, K., Bavithra, S., Ganesh, S. K., & Bhaskar, R.** (2020). Flavonoids: Potential weapon for epigenetic reprogramming in cancer therapy. *Cancer Treatment and Research Communications*, 24, 100184.
- Spoerlein, C., Mahal, K., Schmidt, H., & Jungbauer, A.** (2013). Specific inhibition of NF-κB activation by a copper(II) genistein complex in cancer cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 536(2), 57–65.
- Tan, J., Wang, B., Zhu, L., et al.** (2010). *Synthesis, characterization, antioxidant and cytotoxic activities of quercetin-iron complexes*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(16), 5528–5534.
- Tan, J., Wang, B., Zhu, L., et al.** (2010). Synthesis, characterization, antioxidant and cytotoxic activities of quercetin-iron complexes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(16), 5528–5534.
- Vieira, T. D., & Conte-Junior, C. A.** (2022). Food-derived polyphenols: Anticancer applications and nanotechnology utilization. *Molecules*, 27(4), 1239.
- Williams, R. J., Spencer, J. P. E., & Rice-Evans, C.** (2004). *Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?* *Free Radical Biology and Medicine*, 36(7), 838–849.
- Williamson, G., Kay, C. D., & Crozier, A.** (2018). *The bioavailability, transport, and bioactivity of dietary flavonoids: a review from a historical perspective*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5), 1054–1112.
- Zamora-Ros, R., Not, C., Guinó, E., et al.** (2013). *High consumption of flavonoids is associated with reduced risk of colorectal cancer in the Spanish population: a case-control study*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 22(10), 1894–1901.

CYTOWANE PATENTY

CA2617213A1, Resverlogix Corp. (2007). *Polymorphic forms of compounds that modulate expression of apolipoprotein AI.*

CN101072815A, Li, W., & Lu, Y. (2007). *High-molecular-weight polyphenol and its preparation method and use.*

CN101072815A, Li, W., & Lu, Y. (2007). *High-molecular-weight polyphenol and its preparation method and use.*

CN101214225A, Cao, W., & Zheng, J. (2008). *Preparation method of resveratrol nanoemulsion.*

EP2449536A1, Advanced Orthomolecular Research Inc. (2012). *Compositions containing myricetin and methods for their use.*

EP2449536A1, Advanced Orthomolecular Research Inc. (2012). *Compositions containing myricetin and methods for their use.*

US20050239714A1, Now Foods (2005). *Nutritional supplement bar containing chrysin.*

US20080200537A1, Cleveland, T. E., & Klingeman, W. E. (2008). *Methods for producing and using isoflavonoid-enriched soy product.*

US20080200537A1, Cleveland, T. E., & Klingeman, W. E. (2008). *Methods for producing and using isoflavonoid-enriched soy product.*

US20080213441A1, Ludwig, C. J. (2008). *Microencapsulation of polyphenol.*

US20080234361A1, Harats, D., & Grossman, E. (2008). *Conjugated fatty acids and polyphenols for prevention and treatment of disorders.*

US20080234361A1, Harats, D., & Grossman, E. (2008). *Conjugated fatty acids and polyphenols for prevention and treatment of disorders.*

US20150306153A1, Celestial Seasonings, Inc. (2015). *Herbal tea compositions containing apigenin.*

US7741371B2, Pure Encapsulations, Inc. (2010). *Quercetin compositions and methods of use.*

US8163242B2, Numi Organic Tea (2012). *Tea compositions containing kaempferol.*

US8501229B2, Shaklee Corporation (2013). *Compositions containing resveratrol and methods of use.*

WO2008120220A2, Raju, G. G. (2008). *Synergistic herbal composition of boswellic acids and curcuminoids.*