

***In Vitro* Studies on the Ferric-Ion Reducing Ability of Plant Phenolics and their Pro- and Anti-Oxidant Activity in an Iron-Mediated Hydroxyl Radical Oxidizing System**

Jeffrey E. de Graft-Johnson, M.D.

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirements for the Degree

Doctor of Philosophy

Supervisor: prof. dr. hab. med. Dariusz Nowak

Department of Clinical Physiology

Medical University of Lodz

2014

Abstract

Aside from the pathological consequence of ionizing radiation, inflammation and chemical injury, free radical formation is also a physiological process occurring in respiration and other cellular activities including microbial killing by neutrophils and monocytes. These highly reactive chemical species with an unpaired electron in their outer shell can initiate cellular injury via peroxidation of lipids and oxidation of nucleic acids and proteins in a process well recognized in the pathogenesis of chronic degenerative diseases as well as malignant neoplasms in humans. Endogenous or exogenous anti-oxidants (e.g. vitamin C, and E, β -carotene and a variety of plant phenolics and their metabolites) can either block free radical generation thereby neutralizing their activities or scavenge them once they are formed. Several studies have provided support that consumption of fruits and vegetables as a source of natural anti-oxidants decrease the risk of cardiovascular diseases and various degenerative diseases. A number of proposed mechanisms regarding the beneficial effects of diets rich in fruits and vegetables in human health emanate from compelling evidence of the robust anti-oxidant properties observed *in vitro* from fruit extracts and purified plant polyphenols. However, recent studies have suggested a dual functionality where under certain conditions these compounds can act as pro-oxidants, which raise concerns over the activity of these anti-oxidant compounds under physiological conditions.

Therefore, this work investigated *in vitro* the ferric-reducing ability power (FRAP) of 17 plant phenolics and their metabolites at submicromolar concentrations at biologically-relevant concentrations in human plasma. Furthermore, *in vitro* effects of polyphenols and purified apple quercetin glycosides on plasma FRAP were investigated. This study further determines the anti-oxidant and pro-oxidant effects of selected plant phenolics and their metabolites in addition to TROLOX®, n-acetyl-L-cysteine and ascorbic acid on Fe-mediated $\cdot\text{OH}$ radical deoxyribose oxidation.

Compounds tested included catechin, chlorogenic acid (CA), catechol, 3,4-dihydroxybenzoic acid (3,4-DHBA), 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid (3,4-DHCA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (3,4-DPAA), 3,4-dihydroxycinnamic acid (DCA), ferulic acid (FA), gallic acid monohydrate (GA), 4-hydroxybenzoic acid (4-HBA), quercitrin, quercetin dehydrate, quinic acid, phloretin, , phloridzin dehydrate, phloroglucinol, rutin trihydrate, TROLOX®, n-acetyl-L-cysteine and ascorbic acid. Pooled human plasma was attained from blood samples (3 ml) from six healthy nonsmoking volunteers (mean age 29 ± 4 years; three women and three men). Ethanol apple extracts and purified apple quercetin glycosides were prepared using four kilograms of apples stored in a controlled atmosphere (for 6 months). In determining FRAP, the final concentration of the tested compound in the reaction mixture was 0.1, 0.5, 1, 2.5 and 5 $\mu\text{mol/L}$ while specimen absorbance at 593 nm was continuously measured over 10 min. at 37°C . To determine the effect of plant phenolics and their metabolites on Fe-mediated oxidation of

deoxyribose a $\cdot\text{OH}$ generating system inducing oxidation of deoxyribose ($\text{Fe}^{2+} + \text{EDTA} + \text{H}_2\text{O}_2$) was used. Polyphenols and the other compounds were tested at a final concentration of $10 \mu\text{mol/L}$. Absorbance at 532 nm (A_{532}) was measured against a blank containing deoxyribose alone.

It was determined that apple quercetin glycosides along with various polyphenols displayed a distinct ability to reduce Fe^{3+} ions at physiologically relevant submicromolar concentrations. FRAP correlated positively ($r = 0.60$, $p < 0.05$) with the occurrence of a catechol structure in the compound molecule. An aliphatic substitute positioned at a catechol ring and a double bond in an aliphatic substitute conjugated with an aromatic catechol ring led to 37% of the variance in the FRAP in compounds with catechol in their backbone configuration ($n = 11$). A mixture of $0.2 \mu\text{mol/L}$ of seven of the most active compounds (3,4-DPAA, quercetin, GA, 3,4-DHCA, catechin, FA, DCA) added to plasma, initiated a moderate rise in the FRAP (23.3 ± 1.2 vs. $28.1 \pm 1.3 \text{ nmol of Fe}^{3+}$, $p < 0.05$).

At $0.5 \mu\text{mol/L}$, apple quercetin glycosides did not increase plasma FRAP. Plasma alone had 30 times higher power than quercetin glycosides at $0.5 \mu\text{mol/L}$. The ability to inhibit damage during the *in vitro* experiments of an $\cdot\text{OH}$ radical generating system involving Fe^{2+} , EDTA and H_2O_2 were shown by 5 of the tested polyphenols and their metabolites (DCA, 3,4-DHCA, 4-HBA, catechin, and CA). The analysis of variance (ANOVA) with

an appropriate Bonferroni correction post hoc test revealed a significant difference within anti-oxidant and pro-oxidant compounds ($p < 0.001$). Analysis assessing FRAP and the anti-oxidant/pro-oxidant activity of individual compounds revealed a linear correlation in the presence of all compounds ($r = 0.65$ $p < 0.001$), in the absence of TROLOX® and ascorbic acid, a linear correlation was not evident ($r = 0.22$ $p > 0.05$). It is supposable that a higher pro-oxidant activity (enhancement of deoxyribose oxidation) correlate with higher FRAP. Statistical analysis showed a positive correlation between the numbers of –OH substitutions in the backbone structure of both anti-oxidant and pro-oxidant polyphenols. In the group of pro-oxidant compounds, a higher number of –OH groups had a more deleterious effect on deoxyribose and in the group of anti-oxidant compounds, a higher number of –OH groups was associated with an inhibitory effect. The increase FRAP exhibited in human plasma as compared to polyphenols at submicromolar concentrations may shed light to previous inconsistencies associated with insignificant increases of plasma FRAP several days post ingestion of fruits or vegetables.

The present study confirms previous findings and contributes additional evidence that suggest that intake of comestible products and or supplements rich in polyphenols containing a catechol ring with an aliphatic substitute augments the plasma FRAP in humans. The results of this study support the idea that biological anti-oxidant responses

are most effective within a synergistic network mediated by the diversification of plant phenolics and their metabolites circulating in biofluids.

The results of the studies concerning the ability of polyphenols and their metabolites on the reduction of ions from Fe^{3+} to Fe^{2+} have been published as an original article: "deGraft-Johnson J, Kolodziejczyk K, Krol M, Nowak P, Krol B, Nowak D. Ferric-reducing ability power of selected plant polyphenols and their metabolites: implications for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007;100:345-352."

**Zdolność roślinnych związków fenolowych do redukcji
jonów żelazowych i ich aktywność pro- i
antyoksydacyjna w układzie generującym rodnik
hydroksylowy w reakcji z jonami żelazowymi - badania
*in vitro***

Jeffrey E. de Graft-Johnson, M.D.

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych.

Promotor: prof. dr. hab. med. Dariusz Nowak

Zakład Fizjologii Klinicznej

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

2014

Streszczenie

Oprócz patologicznego wpływu promieniowania jonizującego, wywoływania reakcji zapalnej i uszkodzeń chemicznych tkanek, wytwarzanie wolnych rodników jest w dużej mierze procesem fizjologicznym występującym podczas oddychania komórkowego, biorącym udział w przekazywaniu sygnałów w komórkach czy zabijaniu mikroorganizmów przez neutrofile i makrofagi. Te wysoce reaktywne cząstki chemiczne z niesparowanym elektronem w ich zewnętrznej powłoce mogą inicjować uszkodzenie komórek organizmu poprzez peroksydację lipidów, utlenianie kwasów nukleinowych i białek będąc przyczyną powstawania nowotworów złośliwych i rozmaitych przewlekłych chorób u ludzi.

Endogenne lub egzogenne przeciwutleniacze (np. witamina C, E, β – karoten oraz różne roślinne polifenole, kwasy fenolowe i ich metabolity) mogą albo blokować nadmierne powstawanie wolnych rodników lub usuwać je, gdy te są już obecne w tkankach i w ten sposób neutralizować ich działanie.

Liczne badania potwierdzają, że spożywanie owoców i warzyw będących źródłem naturalnych antyoksydantów zmniejsza ryzyko występowania chorób układu krążenia i licznych chorób zwyrodnieniowych. Postulowanych jest wiele mechanizmów wyjaśniających korzystny wpływ diety bogatej w warzywa i owoce na zdrowie człowieka, między innymi przekonującym dowodem są silne przeciw-utleniające właściwości ekstraktów owocowych i oczyszczonych

polifenoli roślinnych obserwowane w badaniach in vitro. Jednakże najnowsze badania sugerują podwójną funkcjonalność tych związków, gdzie w pewnych warunkach mogą one działać jako pro -utleniacze, co może budzić obawy jeśli chodzi o potencjalny wpływ tych antyoksydacyjnych związków w warunkach fizjologicznych.

Dlatego też celem mojej pracy było zbadanie w układzie in vitro:

1. Aktywności antyoksydacyjnej 17 roślinnych związków fenolowych i ich metabolitów (w stężeniach mikromolowych – zbliżonych do wartości jakie występują in vivo w osoczu u ludzi) mierzonej zdolnością do redukcji jonów żelazowych (Fe^{3+}) do jonów żelazawych (Fe^{2+}) – test FRAP.
2. Wpływu wybranych polifenoli i oczyszczonych glikozydów polifenoli z jabłek na aktywność FRAP osocza.
3. Wpływu związków fenolowych, Troloksu[®], N - acetylo - L - cysteiny i kwasu askorbinowego na utlenianie deoksyrybozy przez system generujący rodniki hydroksylowe ($Fe^{2+} - EDTA-H_2O_2$)

Pośród badanych związków znajdowały się następujące polifenole roślinne i ich metabolity; katechina , kwas chlorogenowy (CA) , katechol , kwas 3,4 -dihydroksybenzoesowy (3,4-DHBA), kwas 3,4 - dihydroksyhydrocynamonowy (3,4-DHCA), kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy (3,4 DPAA-), kwas 3,4-dihydroksycynamonowy (DCA), kwas ferulowy (FA), kwas galusowy (GA), kwas 4-hydroksybenzoesowy (4-HBA), kwercetyna, kwas chinowy, floretyna , florydyna ,

floroglucynol, oraz rutyna. Prócz tego zbadano Trolox® (rozpuszczalna w wodzie pochodna witaminy E), N-acetylo-L-cysteinę i kwas askorbinowy.

Ludzkie osocze uzyskano z próbek krwi (3 ml) od sześciu zdrowych, nie palących ochotników (średnia wieku 29 ± 4 lata, trzy kobiety i trzech mężczyzn). Etanolowy wyciąg z jabłek i oczyszczone glikozydy (kwercetyna) z jabłek zostały przygotowane przy użyciu czterech kilogramów jabłek przechowywanych w kontrolowanej atmosferze (przez 6 miesięcy od zbioru). Przy określaniu FRAP końcowe stężenie badanego związku w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 0,1, 0,5, 1, 2,5 i 5 $\mu\text{mol/L}$, natomiast absorbancja była mierzona w sposób ciągły przy 593 nm w ciągu 10 minut w temperaturze 37°C .

W serii doświadczeń nad wpływem roślinnych związków fenolowych na utlenianie deoksyrybozy w systemie generującym rodniki hydroksylowe ($\text{Fe}^{2+} + \text{EDTA} + \text{H}_2\text{O}_2$) poszczególne związki badano w stężeniu 10 $\mu\text{mol/L}$. Powstające podczas utleniania deoksyrybozy produkty tworzyły barwny kompleks kwasem tiobarbiturowym którego absorbancja przy 532 nm (A_{532}), była miarą utlenienia tego cukru.

Stwierdzono, że glikozydy pochodzące z jabłek (kwercetyna), wraz z innymi polifenolami wykazywały wyraźną zdolność do redukcji jonów Fe^{3+} w stężeniach zbliżonych do występujących *in vivo* w osoczu człowieka. Wykazano pozytywną korelację ($r = 0,60$, $p < 0,05$) między FRAP, a występowaniem pierścienia katecholowego w cząsteczce badanego związku.

Podstawnik alifatyczny znajdujący się w pierścieniu katecholowym i wiązanie podwójne przy podstawniku alifatycznym sprzężonym z pierścieniem aromatycznym odpowiadały za 37 % wariancji FRAP w związkach posiadających pierścień katecholowy w ich podstawowej strukturze ($n = 11$).

Dodanie do osocza mieszaniny siedmiu najbardziej aktywnych związków (3,4-DPAA, kwercetyna, GA, 3,4-DHCA, katechiny, FA, DCA) każdy w stężeniu $0,2 \mu\text{mol/L}$ powodowało umiarkowany wzrost FRAP ($23,3 \pm 1,2$ w porównaniu z $28,1 \pm 1,3 \text{ nmol Fe}^{3+}$, $p < 0,05$). Przy stężeniu $0,5 \mu\text{mol/L}$, glikozydy z jabłek (kwercetyna) nie zwiększyły FRAP osocza. Czyste osocze miało 30 razy większą moc FRAP niż sama kwercetyna przy stężeniu $0,5 \mu\text{mol/L}$.

Spośród 16 badanych związków fenolowych tylko 5 (DCA, 3,4-DHCA, 4-HBA, katechina i CA) hamowały utlenienie deoksyrybozy w systemie generującym rodniki hydroksylowe. Pozostałe nasilały uszkodzenie deoksyrybozy (działanie pro-utleniające). Analiza wariancji (ANOVA) z odpowiednią korektą Bonferroniego (test post hoc) wykazała istotne różnice spośród związków przeciwutleniających i utleniających ($p < 0,001$).

Analiza zależności między FRAP badanych związków a ich wpływem na utlenienie deoksyrybozy wykazała zależność liniową, dla całej grupy związków włączając w to Troloks[®] i kwasu askorbinowy ($r = 0,65$ $p < 0,001$). Nasilanie utlenienia deoksyrybozy korelowało z większą aktywnością FRAP. Dla samej grupy związków polifenolowych nie zaobserwowano tej

zależności ($r = 0,22$ $p > 0,05$). W grupie związków działających ochronnie (antyoksydanty) zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy liczbą grup OH w podstawowej strukturze związku a stopniem hamowania utlenienia deoksyrybozy.

Obecne badania potwierdzają wcześniejsze obserwacje i przedstawiają dodatkowe dowody, które sugerują, że spożywanie produktów lub suplementów bogatych w polifenole zawierające pierścień katecholowy z podstawnikiem alifatycznym może zwiększać FRAP osocza u ludzi. Wyniki tej pracy potwierdzają tezę, że biologiczne reakcje antyoksydacyjne są najbardziej skuteczne w przypadku synergistycznego działania różnorodnych fenoli roślinnych i ich metabolitów w płynach ustrojowych.

" Wyniki badań dotyczące zdolności polifenoli i ich metabolitów do redukcji jonów Fe^{3+} do Fe^{2+} zostały opublikowane jako oryginalny artykuł : deGraft-Johnson J, Kolodziejczyk K, Krol M, Nowak P, Krol B, Nowak D. Ferric-reducing ability power of selected plant polyphenols and their metabolites: implications for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2007;100:345-352."

Conclusions

1. Plant polyphenols are able to reduce Fe^{3+} ions *in vitro*. Of the tested compounds the most active were 3,4-DPAA, quercetin, GA, 3,4-DHCA, catechin, FA and DCA. However their activity was lower than that of ascorbic acid.
2. The occurrence of a catechol in the molecular structure constituted 36% of the variance in FRAP. A double bond in an aliphatic substitute conjugated with an aromatic catechol ring, along with the occurrence of an aliphatic substitute at a catechol ring were the two variables that synergistically contributed to 37% of the variance in the FRAP of compounds with a catechol in its backbone configuration.
3. Polyphenols can affect deoxyribose oxidation by $\text{Fe}^{2+} + \text{EDTA} + \text{H}_2\text{O}_2$ system. Of the tested compounds FA, GA, 3,4-DPAA, phloretin, phloroglucinol catechol, phloridzin and quercetin enhanced and DCA, 3,4-DHCA, 4-HBA, catechin, and CA inhibited deoxyribose oxidation.
4. The number of $-\text{OH}$ groups in the molecule correlated significantly with compounds inhibiting or enhancing the oxidative degradation of deoxyribose. The occurrence of a catechol structure within the compound molecule, the occurrence of an aliphatic and the occurrence of a double bond in an aliphatic substitute conjugated with an aromatic catechol ring correlated significantly with pro-oxidant compounds.

Wnioski

1. Polifenole roślinne są zdolne do redukcji jonów Fe^{3+} w warunkach in vitro. Spośród badanych związków najbardziej aktywne okazały się: kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy, kwercetyna, kwas galusowy, kwas 3,4-dihydroksyhydrocynamonowy, katechina, kwas ferulowy i kwas 3,4-dihydroksycynamonowy. Jednakże ich aktywność była niższa niż kwasu askorbinowego.
2. Występowanie pierścienia katecholowego w cząsteczkach badanych związków odpowiadało za 36% zmienności FRAP. Wiązanie podwójne w podstawniku alifatycznym sprzężonym z aromatycznym pierścieniem katecholowym oraz występowanie alifatycznego podstawnika przy pierścieniu katecholowym razem przyczyniały się do 37% zmienności FRAP związków z pierścieniem katecholowym w swojej strukturze.
3. Polifenole mogą wpływać na utlenianie deoksyrybozy w systemie generującym rodnik hydroksylowy ($Fe^{2+} + EDTA + H_2O_2$). Z pośród badanych związków kwas 3,4-dihydroksycynamonowy, kwas 4-hydroksybenzoesowy, kwas 3,4-dihydroksyhydrocynamonowy, katechina oraz kwas chlorogenowy hamowały utlenienie deoksyrybozy. Natomiast kwas galusowy, kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy, florentyna, katechol, kwercetyna, florydżyna i floroglucynol nasilały uszkodzenie deoksyrybozy.

4. W grupie polifenoli działających ochronnie na deoksyrybozę ich aktywność rosła wraz ze wzrostem liczby grup $-OH$ w cząsteczce związku