

mgr Bogna Gryszczyńska

**Wpływ wybranych kwasów fenolowych
i ekstraktu z pestek maliny właściwej (*Rubus idaeus*)
na aktywność ferroksohydrazową ceruloplazminy**

Rozprawa doktorska

Zakład Chemii Ogólnej

Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego

w Poznaniu

Promotor: dr hab. n. med. Maria Iskra prof. UM

Poznań 2011

Praca finansowana z grantu promotorskiego MNiSW nr 3235/B/P01/2010/39

*Pani dr hab. n. med. prof. UM Marii Iskrze
za wszechstronną pomoc,
cenne wskazówki, życzliwość i ogromne serce
składam najserdeczniejsze podziękowania*

*Dziękuję Najbliższym
za motywację i wsparcie*

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	7
I. WPROWADZENIE	9
II. WSTĘP	10
1. Przeciwutleniacze egzogenne.....	10
1.1.Charaktrystyka przeciwutleniaczy egzogennych.....	10
1.1.1. Kwasy fenolowe.....	10
1.1.2. Flawonoidy.....	11
1.1.3. Lignany	12
1.1.4. Stilbeny	12
1.2.Właściwości przeciwutleniające polifenoli.....	12
1.2.1.Wpływ budowy związków polifenolowych na ich aktywność przeciwutleniającą.....	13
1.3. Biodostępność związków polifenolowych.....	15
1.4. Właściwości chelatujące związków polifenolowych	18
1.5. Właściwości prooksydacyjne związków polifenolowych	22
1.6. Właściwości przeciwutleniające wybranych kwasów fenolowych.....	25
2. Współdziałanie przeciwutleniaczy egzogennych i endogennych.	26
2.1. Witamina E i C.....	27
2.2. Witamina E i Se	28
2.3. SOD i Cp	29
2.4. Związki polifenolowe i enzymy przeciwutleniające.....	30
3. Ceruloplazmina	31
III.CEL PRACY	38
IV. WYKAZ ODCZYNNIKÓW	39
V. MATERIAŁ I METODY	40
1. Izolacja i oczyszczanie ceruloplazminy	40
1.1. Odczynniki	40
1.2. Procedura.....	40
2. Otrzymywanie ekstraktu z pestek maliny.....	41
2.1. Odczynniki.....	41
2.2. Procedura	41
3. Pomiar zdolności do eliminowania Fe(II) przez EPM i kwasy fenolowe z układu badanego.....	42

3.1. Zasada metody	42
3.2. Pomiar aktywności ferroksoydazowej ceruloplazminy	43
3.2.1. Odczynniki	43
3.2.2. Procedura.....	43
3.3. Badanie wpływu ekstraktu z pestek maliny na aktywność ferroksoydazową Cp... ..	43
3.4. Badanie wpływu wybranych kwasów fenolowych na aktywność ferroksoydazową Cp	44
4. Badanie utleniania jonów Fe(II) w obecności kwasów fenolowych	45
4.1. Odczynniki.....	45
4.2. Zasada metody	45
4.3. Procedura	46
5. Kompleksowanie jonów Fe(II) przez kwasy fenolowe	46
5.1. Odczynniki.....	46
5.2. Aparatura	47
5.3. Zasada metody	47
5.4. Procedura	47
6. Analiza statystyczna	47
VI. WYNIKI.....	48
1. Aktywność ferroksoydazowa Cp wyizolowanej z osocza z osocza krwiodawców oraz chorych z PMNT.....	48
2. Wpływ ekstraktu z pestek maliny na aktywność ferroksoydazową Cp wyizolowanej z osocza krwiodawców oraz chorych z PMNT	50
3. Wpływ kwasu kawowego na aktywność ferroksoydazową Cp wyizolowanej z osocza krwiodawców oraz chorych z PMNT.....	54
4. Wpływ kwasu elagowego na aktywność ferroksoydazową Cp wyizolowanej z osocza krwiodawców i chorych z PMN.....	58
5. Wpływ kwasu chlorogenowego na aktywność ferroksoydazową Cp wyizolowanej z osocza krwiodawców i chorych z PMNT	62
6. Wpływ kwasu p-kumarowego na aktywność ferroksoydazową Cp wyizolowanej z osocza krwiodawców i chorych z PMNT	66
7. Wpływ kwasu sinapinowego na aktywność ferroksoydazową Cp wyizolowanej z osocza krwiodawców i chorych z PMNT	70
8. Wpływ kwasu ferulowego na aktywność ferroksoydazową Cp wyizolowanej z osocza krwiodawców i chorych z PMNT	74

9. Utlenianie Fe(II) w obecności kwasów fenolowych	78
10. Kompleksowanie jonów Fe(II) przez kwasy fenolowe	80
VII. DYSKUSJA	87
VIII. WNIOSKI	95
IX. STRESZCZENIE	96
X. ABSTRACT	98
XI. SPIS RYCIN	100
XII. SPIS TABEL	101
XIII. SPIS WYKRESÓW	102
XIV. ANEKS	106
XV. PIŚMIENNICTWO	121

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

$\cdot\text{OH}$ – rodnik hydroksylowy

$\text{ArO}\cdot$ - rodnik aryloksylowy

CAT – katalaza

Cp - ceruloplazmina

Cp_K – ceruloplazmina wyizolowana z osocza krwiodawców

Cp_M – ceruloplazmina wyizolowana z osocza chorych z przewlekłą miażdżycową niedrożnością tętnic kończyn dolnych

CRP – białko C-reaktywne

Cu,Zn-SOD – wewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa

DPPH – 2,2-difenyl-1-pikrylohydrazyl

EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy

EPM - ekstrakt z pestek maliny

EPR – elektronowy rezonans paramagnetyczny

GPx – peroksydaza glutationowa

GSH – glutation zredukowany

GSSG – glutation utleniony

H₂O₂ – nadtlenek wodoru

HDL – frakcja lipoprotein o dużej gęstości

HDL-C – cholesterol frakcji HDL

His – histydyna

HOCl – kwas podchlorawy

LDL – frakcja lipoprotein o małej gęstości

LDL-C – cholesterol frakcji LDL

LSD - dietyloamid kwasu lizergowego

MDA – dialdehyd malonowy

Mn-SOD - mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa wewnątrzkomórkowa

MT – miażdżyca tętnic

NADH - dinukleotyd nikotynamidoadeninowy

NO – tlenek azotu

NO₃⁻ - jon azotanowy

O₂^{•-} - anionorodnik ponadtlenkowy

OCl⁻ - anion kwasu podchlorawego

OH⁻ – grupa hydroksylowa

ONOO⁻ - nadtlenoazotyn

PMNT – przewlekła miażdżycowa niedrożność tętnic kończyn dolnych

PON1 – paraoksonaza

rft - reaktywne formy tlenu

TA – tętniak aorty

TBARS - *Thiobarbituric acid reactive substances* – związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym

TC – cholesterol całkowity

wr - wolne rodniki

I. WPROWADZENIE

Organizm ludzki wyposażony został w enzymy i związki o działaniu przeciwutleniającym chroniące przed niekorzystnym działaniem wolnych rodników i reaktywnych form tlenu, charakteryzujących się dużą reaktywnością oraz zdolnością do uszkodzania komórek i tkanek.

Wyniki badań epidemiologicznych i klinicznych wskazują, że substancje egzogenne mogą również chronić organizm przed działaniem wr i rft. Rolę taką spełniają przeciwutleniacze dostarczane do organizmu wraz z produktami żywnościowymi bogatymi w związki polifenolowe, np.: owoce i warzywa, zielona herbata, czerwone wino. Zainteresowanie tymi składnikami żywności i ich korzystnym wpływem na zdrowie nie słabnie. Wiele z nich obniża ryzyko wystąpienia nowotworów, alergii, chorób układu krążenia, a także może działać przeciwzapalnie. Choć mechanizm działania przeciwutleniającego związków polifenolowych został już niejednokrotnie potwierdzony *in vitro*, to jednak ich współdziałanie z przeciwutleniaczami endogennymi, zwłaszcza reagującymi z tym samym substratem, wymaga jeszcze wielu badań.

Ekstrakt z pestek maliny oraz obecne w nim kwasy fenolowe mogą stanowić grupę substancji egzogennych zdolnych eliminować wolne jony Fe(II), a także Fe(III), ze środowiska i współdziałać z endogennymi przeciwutleniaczami w zapobieganiu generowaniu wr i rft. Relacje między tymi dwiema grupami przeciwutleniaczy wymagają zbadania, gdyż wspólny substrat oraz relacje ilościowe stwarzają warunki do działania konkurencyjnego lub synergistycznego.

II. WSTĘP

1. Przeciwutleniacze egzogenne

Związkami dostarczonymi do organizmu z dietą i wykazującymi właściwości przeciwutleniające są głównie witaminy C, E, A i β -karoten oraz związki należące do grupy polifenoli. Witamina C dostarczana jest do organizmu wraz z pożywieniem. Jej stężenie we krwi zależy od sposobu odżywiania, przebytych chorób i intensywności procesów metabolicznych. Reaktywność witaminy C wobec $O^{\cdot-}_2$, H_2O_2 , $\cdot OH$, $HOCl$, rodników nadtlenkowych i tlenu singletowego jest możliwa dzięki jej silnie redukującym właściwościom. Witamina E (α – tokoferol) chroni przed utlenieniem fosfolipidy obecne w błonach komórkowych, lipidach i lipoproteinach, utrzymuje odpowiedni potencjał redoks komórki, zmiata wolne rodniki organiczne, wygasa tlen singletowy. Głównymi postaciami witaminy A dostarczonymi do organizmu są estry retinolu i prowitaminy, głównie β – karoten. Karotenoidy posiadają zdolność wygaszania tlenu singletowego, reagują z organicznymi rodnikami powstającymi w wyniku peroksydacji lipidów chroniąc błonę komórkową oraz organizm przed nowotworami i starzeniem się.

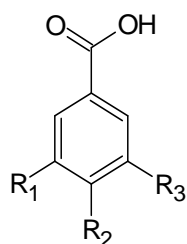
1.1. Charakterystyka związków polifenolowych

Polifenole stanowią bardzo liczną i ważną grupę związków naturalnie występujących w żywności i wykazujących właściwości przeciwutleniające. Ze względu na budowę chemiczną ich podstawowego szkieletu węglowego wyróżnić można następujące podgrupy: kwasy fenolowe, flawonoidy, stilbeny i lignany.

1.1.1. Kwasy fenolowe

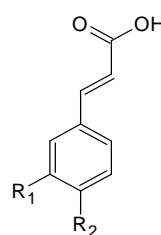
W obrębie kwasów fenolowych wyróżnić można dwie podklasy: pochodne kwasu cynamonowego oraz kwasu benzoowego (ryc. 1). Kwasy hydroksycynamonowe są bardzo rozpowszechnione w przyrodzie, jednak rzadko występują w formie wolnej, a częściej w postaci pochodnych glikozydowych lub estrów z kwasami: chinowym, szikimowym i tartanowym. Natomiast zawartość hydroksypochodnych kwasu benzoowego w roślinach jadalnych jest bardzo mała, z wyjątkiem niektórych czerwonych owoców (truskawki, maliny, jeżyny), cebuli i herbaty [1].

Kwasy hydroksybenzoesowe



$R_1=R_2=OH, R_3=H$: Kwas protokatechowy
 $R_1=R_2=R_3=OH$: Kwas galusowy

Kwasy hydroksycynamonowe



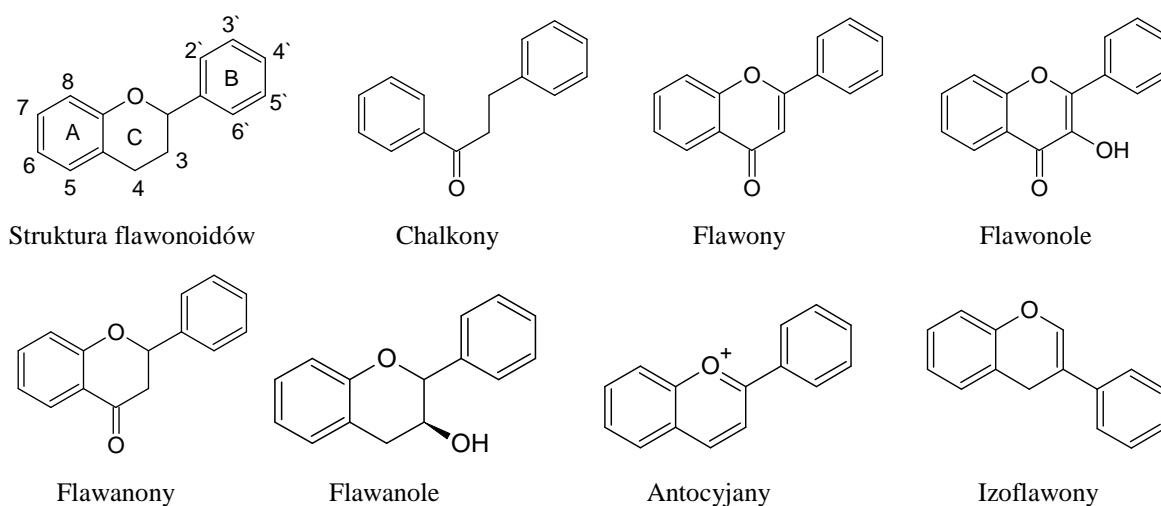
$R_2=OH$: Kwas p-kumarowy
 $R_1=R_2=OH$: Kwas kawowy
 $R_1=OCH_3, R_2=OH$: Kwas ferulowy

Ryc. 1. Struktura kwasów fenolowych.

Morgan J.M.: Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissue.
Free Radic Biol Med. 1998, 22, 861-870.

1.1.2. Flawonoidy

Cząsteczki związków należących do grupy flawonoidów opierają się na układzie dwóch pierścieni benzenowych połączonych łańcuchem trójwęglowym lub pierścieniem heterocyklicznym. Ze względu na duże zróżnicowanie w budowie i właściwościach przeciwutleniających dokonano podziału flawonoidów na podklasy: flawony, flawonole (katechiny i proantocyjanidyny), flawanony, flawany, antocyjany, izoflawony oraz chalkony (ryc. 2).



Ryc. 2. Struktura poszczególnych podklas flawonoidów.

Bravo L.: Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998, 56 (11): 317-333.

1.1.3. Lignany

Cechą charakterystyczną budowy lignanów jest obecność dwóch jednostek *p*-hydroksyfenylopropanowych. Związki te występują w ścianach komórkowych zbóż oraz nasion, które mogą być uwolnione po spożyciu przez człowieka na skutek działania bakterii jelitowych. Wyjątkowo dużo lignanów zawiera siemię lniane oraz ziarno sezamowe, ale występują one również w owocach (jagody), warzywach (czosnek, marchew), roślinach strączkowych, jak również w herbacie i czerwonym winie.

1.1.4. Stilbeny

Stilbeny są niskocząsteczkowymi składnikami komórek, pochodnymi difenyloetenu, należącymi do fitoaleksyn wykazujących właściwości antybakteryjne i przeciwgrzybiczne. Kluczowym enzymem biorącym udział w ich syntezie jest syntaza stilbenowa katalizująca między innymi reakcję kondensacji *p*-kumarylo-S-CoA i trzech cząsteczek malonylo-S-CoA, prowadzącą do powstania resweratrolu. Jego stężenie w winie ściśle powiązane jest z aktywnością patogenów roślinnych (*Botrytis cinerea*) wywołujących infekcje winorośli, co jednocześnie wpływa na jego zwiększoną syntezę.

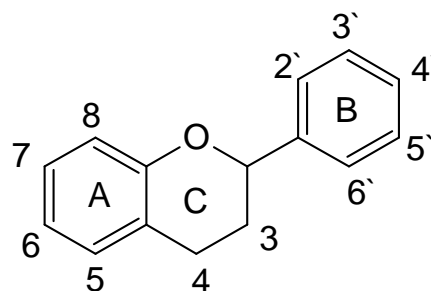
1.2. Właściwości przeciwutleniające polifenoli

Rozwój badań nad właściwościami przeciwutleniającymi związków polifenolowych był związany z poszukiwaniem przyczyn istotnej różnicy w częstości występowania chorób układu sercowo-naczyniowego między mieszkańcami krajów śródziemnomorskich i krajów wysoko-uprzemysłowionych zachodniej Europy. Badania prowadzone w roku 1970 w ramach projektu *Seven Countries Study* wykazały niższą zachorowalność na chorobę wieńcową w krajach śródziemnomorskich, co przypisano charakterystycznemu dla tego regionu Europy sposobowi odżywiania [2]. Natomiast w roku 1979 St. Leger i współpracownicy zaobserwowali odwrotną zależność między umieralnością na choroby serca a spożyciem wina [3]. Określenie „francuski paradoks” wprowadzone przez Richarda w 1987 roku miało na celu podkreślenie, iż pomimo spożywania znacznej ilości tłuszczów zwierzęcych, Francuzi rzadziej chorują na miażdżycę w porównaniu z mieszkańcami innych krajów Europy zachodniej, co może być związane ze znacznym spożyciem czerwonego wina [4]. Kolejne podejmowane projekty badawcze miały na celu wyjaśnienie

szczególnych właściwości czerwonego wina. Okazało się, iż jest ono bogate w związki polifenolowe, szczególnie resweratrol i kwercetynę, dzięki którym wykazuje właściwości przeciwutleniające, rozszerzające naczynia krwionośne i przeciwzapalne [5, 6]. Działanie takie przejawia się przede wszystkim w regulacji stężenia lipoprotein dużej i małej gęstości (HDL i LDL), zapobieganiu utlenianiu LDL, hamowaniu adhezji i agregacji płytek krwi [7]. Intensyfikacja badań nad związkami polifenolowymi i wyjaśnienie przyczyn i mechanizmów korzystnego działania czerwonego wina na organizm człowieka spowodowało, iż zainteresowanie tą grupą związków nie słabnie. Poszukiwane są przede wszystkim nowe polifenole oraz ich źródła, a także badane są ich przeciwutleniające właściwości w kierunku zapobiegania lub ograniczania rozwoju różnych chorób.

1.2.1. Wpływ budowy związków polifenolowych na ich aktywność przeciwutleniającą

Korzystne farmakologiczne oddziaływanie flawonoidów wynika przede wszystkim z ich aktywności przeciwutleniającej ściśle powiązanej z budową, a szczególnie wzajemnym położeniem podstawników chemicznych (Ryc.3), oraz ze zdolnością do inhibicji enzymów generujących wolne rodniki i reaktywne formy tlenu (oksydazy, reduktazy).



Ryc.3. Podstawowa struktura flawonoidów.

Wang H.: Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis.
Trends Food Sci Tech. 2000, 11, 152-160

Wielu autorów wskazuje, iż mogą one nie tylko ograniczać reakcje inicjowane przez wolne rodniki, ale i nie dopuszczać do ich generowania. Co więcej wykazują zdolność do chelatowania jonów metali przejściowych, ograniczając ich udział w generowaniu wolnych rodników (wr) i reaktywnych form tlenu (rft), a także regenerować inne niskocząsteczkowe przeciwutleniacze (kwas askorbinowy).

Badania prowadzone przez Van Ackera i współpracowników miały na celu ocenić wpływ budowy wybranych flawonoidów na aktywność przeciwutleniającą [8]. W piśmiennictwie naukowym aktywność tą określaną często jako *structure activity relationships* SAR, którą ocenia się na podstawie zdolności poszczególnych związków do zmiatania m.in.: rodnika hydroksylowego HO[•] i anionorodnika ponadtlenkowego O₂^{•-}. Jak wskazują autorzy, obecność grupy OH przyłączonej do węgla C3 w strukturze flawonoidów odgrywa szczególną rolę w przypadku zmiatania rodników O₂^{•-}. Grupa ta przyłączona do pierścienia B nadaje wysoką stabilność rodnikowi aryloksylowemu (ArO[•]), poprzez utlenienie do formy chinonowej [9] lub delokalizację elektronu [10]. Oceniając zdolność flawonoidów do zmiatania HO[•], ugrupowanie to nie odgrywa istotnej roli, podobnie jak obecność wiązania podwójnego między C2 a C3, co nie jest zaskakujące ze względu na najwyższą reaktywność rodników HO[•] w grupie rft [11].

Flawonoidy zawierające ugrupowanie katecholowe w pierścieniu B charakteryzują się wysokimi zdolnościami zmiatania wolnych rodników. Wydaje się więc, że pozostała część struktury flawonoidu w przypadku obecności tego ugrupowania nie odgrywa znaczącej roli. Niezwykle wysoką zdolnością do zmiatania wolnych rodników charakteryzuje się kwercetyna, zawierająca oprócz ugrupowania katecholowego jeszcze wiązanie podwójne między C2-C3 oraz grupę hydroksylową przyłączoną do węgla C3. Wykazano, iż flawonoidy zawierające w swej strukturze grupę hydroksylową przyłączoną do węgla C7 nie wykazują zdolności do zmiatania wolnych rodników. Natomiast wprowadzenie grupy pirogallolowej w pierścień B zamiast ugrupowania katecholowego znacznie wzmaga tą aktywność (mirycetyna). Jednak Cotelle i współpracownicy sugerują, iż związki zawierające to ugrupowanie mogą wykazywać aktywność prooksydacyjną i generować anionorodnik ponadtlenkowy [12]. Wprowadzenie grupy metylowej czy też etylowej w pozycję 4' flawonoidu może uaktywniać grupę 3'-OH (hesperetyna, hesperydyna), co wpływa na podwyższenie jego aktywności przeciwutleniającej w porównaniu ze związkami mającymi wyłącznie grupę hydroksylową w 3' (naryngenina, apigenina).

Jak wskazują doniesienia literaturowe, antocyjanidyny są bardzo dobrymi zmiataczami wolnych rodników [13]. Charakteryzują się one bowiem bardzo niskim potencjałem utleniającym, który w zależności od warunków reakcji powoduje pojawienie się ich właściwości przeciwutleniających lub proutleniających [14]. Ich wysoka aktywność związana jest z charakterystyczną budową, a mianowicie obecnością atomu O w pierścieniu C (jon oksoniowy).

Rozpatrując zdolność flawonoidów do kompleksowania jonów metali przejściowych wydaje się, że występowanie grupy hydroksylowej w pozycji C3 związku odgrywa znacznie ważniejszą rolę niż grupa hydroksylowa przyłączona do węgla C5. Także występowanie ugrupowania katecholowego w cząsteczce podwyższa jej zdolność do chelatowania jonów metali przejściowych, w porównaniu ze związkami zawierającymi grupę hydroksylową przyłączoną do C5. Wykazano, że takie związki, które mogą kompleksować jony metali poprzez ugrupowanie C5-OH oraz O=4 są słabymi chelatorami.

Dyskusyjna jest natomiast rola ugrupowania hydroksylowego połączonego z C3 w cząsteczce flawonoidu. Podczas gdy wielu autorów wskazuje na jej ogromną rolę, w szczególności w grupie związków zawierających wiązanie podwójne między C2 a C3, inni sugerują, iż glikozylacja tego ugrupowania w znacznym stopniu maskuje ich aktywność przeciwutleniającą, a nawet całkowicie niweluje [15, 16]. Wydaje się jednak, iż mimo tego, że glikozyd może maskować ugrupowania odpowiedzialne za chelatowanie, w przypadku dostępności innych grup mogących również kompleksować jony metali, nie ma to większego znaczenia.

Ugrupowanie katecholowe w pierścieniu B znacznie poprawia właściwości przeciwutleniające u flawonoidów, jednak takiego wpływu nie obserwuje się w przypadku polimetylowanych flawonoidów. Ponieważ polimetylowane flawonoidy nie tworzą aroksylowych rodników, na pewno nie mogą działać jako zmiatacze wolnych rodników, mogą jednak kompleksować jony metali.

1.3. Biodostępność związków polifenolowych

W ostatnich latach można zaobserwować znaczny wzrost prowadzonych badań mających na celu określenie biodostępności i jej wpływu na aktywność biologiczną poszczególnych związków fenolowych. Rozpowszechnione są również badania mające na celu wyjaśnienie jakim procesom metabolicznym one ulegają i jaka ich część ulega wchłonięciu.

Ustalenie przeciętnej dziennej dawki związków polifenolowych, jaką spożywa człowiek jest bardzo trudne. Utrudnienia te wynikają przede wszystkim z różnych nawyków żywieniowych ludności, a także z braku danych o stężeniach poszczególnych związków fenolowych w produktach spożywczych. Wyznaczenie takiej dawki jest jednym z warunków określenia biodostępności poszczególnych związków, która „definiowana jest jako część dawki substancji przenikająca do krążenia ogólnego i uczestnicząca

w fizjologicznych procesach organizmu i/lub akumulowana w nim”. Na wartość tą wpływa między innymi czas, po którym zostanie osiągnięte największe stężenie danego związku we krwi, a także sposób jej podania. Wartość tą opisują następujące parametry: „pole powierzchni pod krzywą przedstawiającą zależność stężenia badanej substancji we krwi od czasu (AUC, *area under the curve*), czas po którym zostanie osiągnięte stężenie maksymalne danego związku we krwi oraz wartość maksymalnego stężenia” [17]. Bierze się również pod uwagę biologiczny okres półtrwania danego związku mówiący o czasie, po którym jego stężenie we krwi zmniejsza się o połowę. Badania wskazują, że stężenie flawonoidów w osoczu osiąga poziom μM i jest niższe w porównaniu z wartościami średnich stężeń przeciwutleniaczy endogennych tj.: kwasu askorbinowego i moczowego [17].

Związki polifenolowe trafiając wraz z pożywieniem do przewodu pokarmowego ulegają przemianom, a następnie wchłanianiu. Sugeruje się, iż pierwszym etapem metabolizmu flawonoidów przyjmowanych z pokarmem jest deglikozylacja, a następnie koniugacja. Powstające wówczas pochodne sulfonowe, hydroksylowe, glukuronowe i metylowe flawonoidów znacznie częściej występują we krwi niż ich aglikony. Na tych etapach przemian nie bez znaczenia wydaje się być natura aglikonu flawonoidu, a także rodzaj i miejsce przyłączenia pochodnej cukrowej. Wykazano, że glukozydy kwercetyny ulegają deglikozylacji w jelicie cienkim szczurów z udziałem β -glukozydaz, natomiast 3-O-ramnoglukozyd kwercetyny (rutyna) takiej reakcji nie ulega [18]. Hollman i współpracownicy dowiedli, że kwercetyna jest znacznie lepiej przyswajalna w formie glikozydów niż w postaci czystej lub jako rutyna (3-O- β -rutynozyd). Sformułowali również wniosek, iż glukozydy kwercetyny wchłaniane są w jelicie cienkim, natomiast 3-O- β -rutynozyd dopiero w jelicie grubym. Co więcej, jej okres półtrwania może wynosić nawet 20 godzin, co może świadczyć o jej wysokiej zdolności do kumulowania się w organizmie [19].

Piskuła i współpracownicy dowiedli, że jednym z głównych parametrów wpływających na wchłanianie flawonoidów jest ich rozpuszczalność [20]. Okazuje się również, iż właściwe rozdrobnienie pokarmu w jamie ustnej może w znaczący sposób wpłynąć na ich uwolnienie. Na tym odcinku przewodu pokarmowego zachodzi przede wszystkim częściowa hydroliza glikozydów flawonoidów [21]. Natomiast w żołądku, ze względu na jego mniejszą w porównaniu z jelitami powierzchnię, wchłanianie związków polifenolowych następuje w nieznacznym stopniu. Murota i współpracownicy sugerują jednak, iż aglikony flawonoidów mogą ulegać sprzężaniu z kwasem glukuronowym

w błonach śluzowych żołądka, a następnie wchłonięciu [22]. Dalsze trawienie i wchłanianie następuje w jelicie cienkim z wykorzystaniem dwóch mechanizmów. Jednym z nich jest hydroliza glikozydów flawonoidów w świetle jelita cienkiego przez β -glikozydazy. Mogą one także być transportowane do enterocytów z udziałem SGLT1 (*sodium-dependent glucose transporter*). Glikozydy ulegają hydrolizie do aglikonów pod wpływem β -glikozydaz obecnych w cytosolu komórek. Drugim prawdopodobnym mechanizmem jest hydroliza przez *lactase-phlorizin hydrolase (LPH)* obecną w błonach komórkowych kosmków jelita, a uwalniane dzięki jego aktywności aglikony w bezpośrednim sąsiedztwie błony komórkowej wnikają do cytosolu na zasadzie dyfuzji [18].

Jeżeli chodzi o izoflawony, doniesienia literaturowe nie wskazują jednoznacznie, która z form, wolna czy związana, jest lepiej przyswajalna. Zespoły badawcze Maubacha oraz Honga wykazały, że daidzeina i genisteina, mimo ich krótkiego okresu półtrwania w porównaniu z kwercetyną, gromadzą się w tkankach gruczołu sutkowego kobiet oraz gruczołu krokowego mężczyzn [23,24]. Potwierdza to ich zdolność do kumulowania się w organizmie.

Antocyjany są grupą związków bardzo słabo wchłanianych, a przeprowadzone badania nad ich biodostępnością wykazują, iż stężenie ich w osoczu może kształtować się na poziomie nM. Podobnymi właściwościami charakteryzują się proantocyjanidyny. Holt i współpracownicy wykazali, że spolimeryzowane proantocyjanidyny nie ulegają wchłonięciu bez uprzedniej depolimeryzacji odbywającej się w jelicie grubym [25].

Kwasy fenolowe jak np.: kwas kawowy czy kwas galusowy, są dobrze wchłaniane. W mniejszym stopniu wchłanianiu ulegają: katechiny, flawanony i kwercetyna w formie glikozydów. Do najslabiej wchłanianych zaliczyć należy proantocyjanidyny, pochodne galusowe katechin, a także antocyjany [26]. Wykazano również, iż absorpcja katechin wzrastała w przypadku spożywania ich w postaci kapsułek, kiedy to przyjmowano je na czczo. Co więcej, zaobserwowano niewielki, ale znaczący wzrost aktywności przeciwutleniającej osocza w porównaniu z wynikami, jakie uzyskano dla grupy badanej spożywającej polifenole wraz z czarną lub zieloną herbatą. Zaabsorbowane związki polifenolowe ulegają metylowaniu, przekształceniu w pochodne siarczanowe lub cukrowe w błonie śluzowej jelita cienkiego. Wykazano, iż galusan epigalokatechiny i galusan epikatechiny występują w osoczu w postaci wolnej, natomiast epikatechiny i epigalokatechiny dominują jako pochodne siarczanowe i glukuronidowe. Natomiast

stężenia galusanu epigalokatechiny i galusanu epikatechiny w moczu kształtowały się na bardzo niskim poziomie [27].

Właściwości przeciwutleniające flawonoidów wynikają z zachowania struktury chemicznej umożliwiającej zmiatanie wolnych rodników, chelatowanie jonów metali i hamowanie aktywności oksydaz. Sprzęganie flawonoidów w formy glikozydowe w krążeniu ogólnym zmniejsza najczęściej aktywność przeciwutleniającą w stosunku do formy wolnej (aglikonu). Pozostaje więc otwarte pytanie, czy właściwości przeciwutleniające flawonoidów oceniane w warunkach *in vitro* zachowane są po ich wchłonięciu z przewodu pokarmowego.

1.4. Właściwości chelatujące związków polifenolowych

Dzienne spożycie związków polifenolowych w diecie krajów Europy zachodniej wynosi około 1g [28]. Ze względu na to, iż żelazo Fe(II) bardzo łatwo utlenia się do Fe(III), proces ten może nieść za sobą pewne niebezpieczeństwa. Podczas gdy jony żelaza Fe(III) są biologicznie mniej aktywną formą, jony Fe(II) są odpowiedzialne za powstawanie rft, które mogą inicjować peroksydację lipidów, kwasów nukleinowych oraz białek. $O_2^{\cdot-}$ może być generowany podczas jednoelektronowej redukcji O_2 przez Fe(II). H_2O_2 może powstawać w reakcjach enzymatycznych albo jako produkt dysmutacji $O_2^{\cdot-}$, który podczas reakcji Fentona może być przekształcony w rodnik hydroksylowy. Reakcja ta może być katalizowana przez jony metali przejściowych m.in.: żelaza Fe(II), które po przyłączeniu do cząsteczki tlenu prowadzą do powstania bardzo reaktywnego jonu perferrylowego [Fe(II)- O_2].

Pierwszym sygnałem wskazującym na to, iż lipidy ulegają peroksydacji inicjowanej ta przez jony Fe(II) jest nieprzyjemny zapach żywności. Proces ten uznany jest również za jedną z głównych toksycznych reakcji zachodzących w organizmie [29].

Status redoks żelaza ma niewątpliwie wpływ na jego absorpcję w jelitach. Dominującą formą jonową w układach biologicznych są jony Fe(II) i Fe(III). Żelazo w żywności istnieje jako Fe(III) i w dużej części ulega redukcji przez różnego rodzaju składniki obecne w pożywieniu. Czynnikiem redukującym może być kwas askorbinowy zwiększający stężenie Fe(II) oraz jego dostępność i absorpcję. Ta forma jonowa bowiem jest lepiej rozpuszczalna w pH = 7,4.

Wiele doniesień literaturowych wskazuje, iż autooksydacja Fe(II) jest zależna od czynników takich jak: pH, bufory, dostępność chelatorów [30,31]. Jony żelaza rzadko

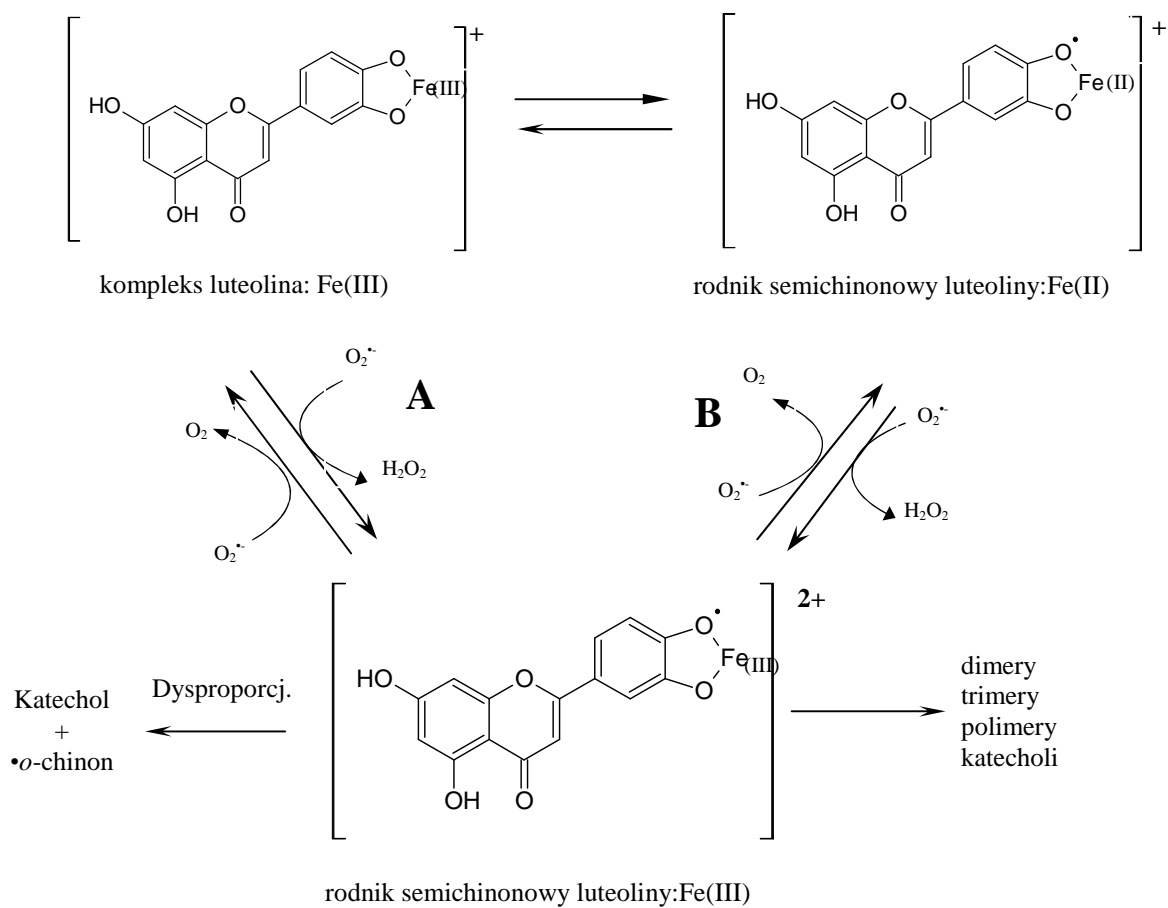
występują w formie wolnej w warunkach fizjologicznych, a ligandy przyłączone do jonów znacznie ograniczają ich reaktywność. Szybkość procesu autooksydacji Fe(II) w dużym stopniu zależy od układu buforującego. Jak donosi Welch, najmniejszy wpływ na proces autooksydacji Fe(II) wydaje się mieć bufor HEPES [30].

Chvátalová i współpracownicy wykazali, że polifenole posiadające katecholowe lub gallolowe ugrupowanie w znaczący sposób wpływają na wzrost szybkości utleniania Fe(II) [32]. Zastosowanie fizjologicznego pH wpływa na tworzenie stabilnych termodynamicznie chelatów Fe(II) i Fe(III) z katecholami, które w tym przypadku pełnią rolę ligandów dwukleszczowych. We wcześniejszych badaniach wykazano, iż ugrupowanie katecholowe jest odpowiedzialne za właściwości chelatujące związków, w których się znajduje. Jednakże duża szybkość utleniania Fe(II) przez tlen w obecności kwasów z ugrupowaniem katecholowym sprawia, iż nie tworzą one chelatów z Fe(II) ale z Fe(III). Utlenianie Fe(II) było bardziej wydajne w obecności kwasów fenolowych posiadających ugrupowanie katecholowe niż w przypadku tych kwasów, które zawierają grupę gallolową. Kwasy fenolowe okazały się bardziej efektywnymi w porównaniu z odpowiadającymi im fenolami nie zawierającymi grupy karboksylowej (COO⁻). Przykładowo, kwas protokatechowy i kwas galusowy były bardziej wydajne w porównaniu z katecholem i metylogalusanem. Tak więc ujemny ładunek grupy karboksylowej kwasu fenolowego wydaje się wspomagać stabilizację ładunku Fe(III). Metylogalusan okazał się najmniej efektywny spośród analizowanych w tych badaniach związków, gdyż powodował jedynie wzrost szybkości utleniania Fe(II) w przypadku zastosowania równomolowych stężeń kwasu i żelaza. W tym przypadku bardzo szybko następuje kompleksowanie jonów Fe(II), co ogranicza proces autooksydacji.

Po spożyciu pokarmu znaczne ilości 'wolnego' żelaza ulegają przyswojeniu, na co ma wpływ m.in.: pH żołądka [32]. Podczas procesów trawienia pokarmu może dojść do różnego rodzaju interakcji między polifenolami pochodzenia roślinnego a jonami żelaza. Związki polifenolowe chelatują jony Fe(III) zmieniając ich rozpuszczalność i reaktywność. Dzienna dawka związków polifenolowych spożyta wraz z napojami czy owocami może być wysoka. Wykazano, iż kawa i herbata istotnie obniżają wchłanianie żelaza niehemowego, co może być spowodowane kompleksowaniem jonów żelaza przez zawarte w nich polifenole. Obie formy jonowe żelaza zostają wchłaniane, jednak spośród nich jony Fe(II) ulegają temu procesowi znacznie łatwiej, a więc związki mogące obniżyć proporcję Fe(II)/Fe(III) mogą również ograniczać wchłanianie żelaza w organizmie.

Istotna jest różnica w zdolności do zmiatania wolnych rodników przez flawonoidy i ich kompleksy z jonami metali. Badania takie prowadził zespół Moridaniego, który oceniał zdolność wybranych flawonoidów, a także flawonoidów skompleksowanych z Cu(II), Fe(II) i Fe(III), do zmiatania $O_2^{\bullet-}$ [33]. Okazało się, iż kompleksy flawonoidów z jonami metali w stosunku 2:1 zmiatają rodniki $O_2^{\bullet-}$ efektywniej w porównaniu z wolnymi flawonoidami. Prawdopodobnie w tej formie flawonoidy ulegają łatwiej utlenianiu przez $O_2^{\bullet-}$. Wyniki te zestawiono z danymi uzyskanymi dla deferoksyaminy – stosownego klinicznie chelatora jonów żelaza i stwierdzono, iż kompleks deferoksyamina:Fe(III) nie zmiata $O_2^{\bullet-}$, co może sugerować, iż nieodzownym etapem reakcji zmiatania tego rodnika jest tworzenie kompleksu między Fe(III) a flawonoidem. Nie bez znaczenia dla chelatowania jest również budowa flawonoidu. Potwierdzono, że flawonoidy zawierające ugrupowanie hydroksylowe w pozycji C3 i C4', a także wiązanie podwójne między C2 i C3 są niezbędnymi elementami budowy dobrego chelatora (kwercetyna, fisetyna, kemferol), a co za tym idzie pozwalają na częściowe utlenienie flawonoidu przez $O_2^{\bullet-}$. Ze względu na to, iż katechina i taksyfolina nie posiadają wiązania podwójnego między C2 i C3 oraz grupy –OH przyłączonej do C3, a luteolina nie ma w swej strukturze grupy –OH w pozycji C3, nie utleniają się po skompleksowaniu jonów metali. Podobnie dzieje się z rutyną, której ugrupowanie 3-OH zablokowane jest przez węglowodan. Okazało się także, iż w przypadku inkubacji flawonoidów bez udziału żelaza wykazywały one znacznie niższą zdolność do ochrony komórek przed uszkodzeniami wynikającymi z niedotlenienia. Tego rodzaju związki kompleksowe zawierające flawonoidy i jony Fe(II), Fe(III) i Cu(II) w stosunku stężeń 2:1 znacznie lepiej zmiatają $O_2^{\bullet-}$ generowany w układzie oksydaza ksantynowa/hipoksyantyna w porównaniu z wolnymi flawonoidami.

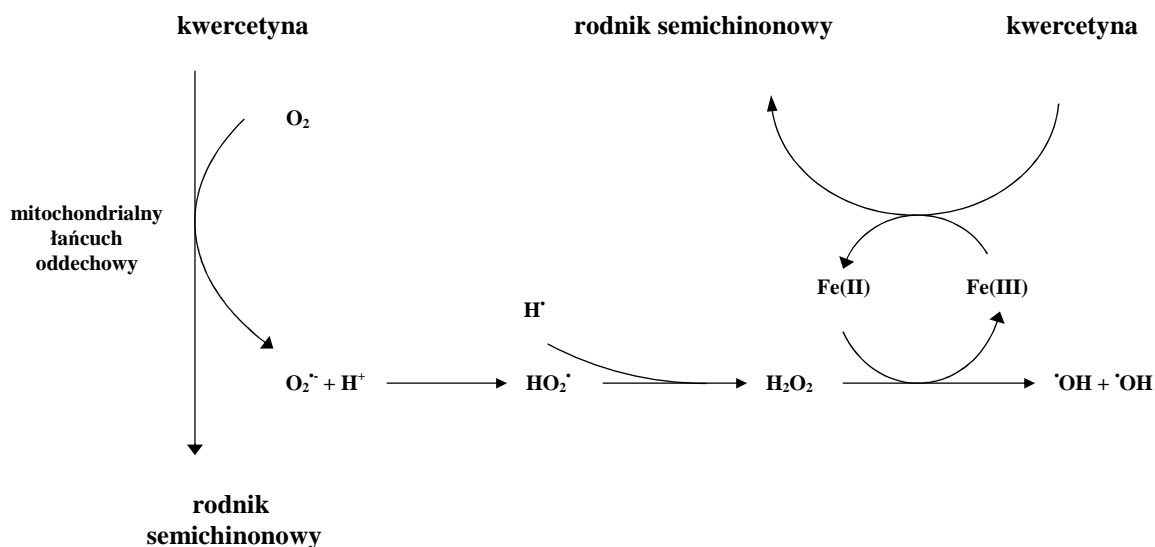
Mechanizm zmiatania $O_2^{\bullet-}$ przez kompleks luteolina:Fe(III) został wyjaśniony przez Moridaniego i zespół [33], w oparciu o cykl przemian, jakim mogą ulegać katechole (Ryc.4.) [34]. Luteolina wiążąc jon Fe(III) tworzy związek kompleksowy, który dalej może ulec utlenieniu przez $O_2^{\bullet-}$ do semichinonowej formy [rodnik semichinonowy luteoliny:Fe(III)] (A). Dalsze przemiany tej formy kompleksowej mogą prowadzić do powstania początkowego katecholu oraz o -chinonu na drodze reakcji dysproporcjonowania. Związek ten może także ulec przekształceniom prowadzącym do powstania dimerów, trimerów oraz polimerów luteoliny. Rodnik semichinonowy luteoliny:Fe(III) może ulec również redukcji w reakcji z kolejnym $O_2^{\bullet-}$ prowadzącej do powstania rodnika semichinonowego luteoliny:Fe(II) (B), który to samorzutnie przekształcany jest w związek kompleksowy luteolina:Fe(III).



Ryc.4. Mechanizm zmiatania anionorodnika ponadtlenkowego przez związek kompleksowy katechol:żelazo na przykładzie luteoliny.

1.5. Właściwości prooksydacyjne związków polifenolowych

Niejednokrotnie udowodniono działanie przeciwzapalne, przeciwnowotworowe i przeciwmiażdżycowe związków polifenolowych [35, 36]. Cao i współpracownicy dowiedli, iż te same flawonoidy mogą wykazywać silne właściwości przeciwutleniające, jak i również prooksydacyjne, uzależnione od ich stężenia i źródła wolnych rodników [37]. Prooksydacyjne właściwości kwasu kawowego ujawniały się m.in. w reakcji utleniania LDL indukowanej jonami Cu(II) [38]. Wykazano, iż aktywność przeciwutleniająca oraz prooksydacyjna flawonoidów ściśle zależy od ich struktury [37]. Flawony i flawanony, które w swych strukturach nie posiadają grupy OH, nie wykazały ani aktywności przeciwutleniającej ani prooksydacyjnej inicjowanej przez Cu(II). O-metylacja i prawdopodobnie inne O-modyfikacje flawonoidów pozbawiają je aktywności przeciwutleniającej i prooksydacyjnej. W żywności flawonoidy występują przede wszystkim jako O-glikozydy, w których to cukier przyłączony jest do węgla C-3. Utrata prooksydacyjnej aktywności flawonoidów, inicjowanej przez metale przejściowe, poprzez metylację lub glikozydowe modyfikacje tych związków może więc mieć fizjologiczne i farmakologiczne znaczenie. Wydaje się, iż aktywność prooksydacyjna flawonoidów oraz innych przeciwutleniaczy (kwas askorbinowy, α -tokoferol) inicjowana jonami Cu(II) nie ma większego znaczenia *in vivo*, gdyż jony Cu(II) pozostają w dużym stopniu związane z białkami. Wyniki uzyskane przez innych badaczy potwierdziły hipotezę, iż obecność jonów metali przejściowych może sprzyjać ujawnianiu się właściwości prooksydacyjnych związków polifenolowych, czego dowodem jest zdolność katalizowania procesów degradacji DNA i modyfikacji zasad purynowych i pirymidynowych przez kwas kawowy i kwercetynę [39,40,41]. Mechanizm reakcji obrazującej prooksydacyjną aktywność kwercetyny zaproponował Hodnick sugerując, iż autooksydacja kwercetyny oraz powstawanie rodników kwercetyny poprzez interakcje z mitochondrialnym transportem elektronów prowadzi do powstania $O_2^{\bullet-}$ (rycina 5). Kwercetyna może redukować jony Fe(III) do Fe(II), co sprzyja generowaniu najbardziej reaktywnego rodnika hydroksylowego $\bullet OH$ w reakcji Fentona i Habera-Weissa [42].



Ryc. 5. Udział kwercetyny w generowaniu wolnych rodników w obecności O_2 lub $Fe(III)$.

Galati i współpracownicy dowiedli, iż semichinonowe rodniki polifenoli zawierających ugrupowanie katecholowe w swej strukturze (kwas kawowy, kwercetyna) mogą łatwiej utleniać askorbinian w porównaniu z ich odpowiednikami zawierającymi układ fenolowy (kwas p-kumarowy, kempferol) [43]. Wykazali także, iż flawonoidy zawierające w swej strukturze układ katecholowy, nie zawierające jednak 2-3 wiązań podwójnych, znacznie słabiej katalizują utlenianie askorbinianu. Utlenianie wewnątrzkomórkowego askorbinianu przez kwercetynę i kempferol może wskazywać na to, iż rodniki semichinonowe tych flawonoidów są prawdopodobnie odpowiedzialne za wyczerpanie askorbinianu w hepatocytach. Związki polifenolowe obecne w diecie, zawierające układ fenolowy, mogą być metabolizowane przez peroksydazę do rodników fenolowych. Ich prooksydacyjny charakter sprawia, że są na tyle reaktywne, aby utleniać GSH i NADH w hepatocytach. Inkubacja komórek wątrobowych z związkami polifenolowymi zawierającymi układy fenolowe prowadziła do utlenienia GSH do GSSG, natomiast reakcja prowadzona ze związkami polifenolowymi zawierającymi ugrupowanie katecholowe obniżyła stężenie GSH poprzez tworzenie konjugatów z GSH. Badacze zaobserwowali również, że polifenole zawierające układy fenolowe znacznie łatwiej utleniają ludzką oksyhemoglobinę oraz przyczyniają się do hemolizy erytrocytów.

Wiele flawonoidów, w tym kwercetyna, może wykazywać właściwości mutagenne i kancerogenne [44,45]. Molekularny mechanizm działania mutagennego flawonoidów nie jest jeszcze do końca poznany. Jednakże zaobserwowano, iż właściwości te ujawniają się w aerobowych warunkach, co wskazuje na istotną rolę O_2 w tym procesie [46]. Badania wykazały, iż kwercetyna, mirycetyna i kemferol indukują peroksydację lipidów oraz uszkodzenia nici DNA. Okazało się, iż proces ten inicjują reaktywne formy tlenu wygenerowane w czasie ich autooksydacji lub podczas przemian w cyklu reakcji redoks, jakim mogą one ulegać [47,48]. Zaobserwowano również obniżenie stężenia glutationu oraz niższą aktywności transferazy S- glutationowej w izolowanych jądrach hepatocytów przez flawonoidy. To z kolei może być przyczyną stresu oksydacyjnego. Osłabienie naturalnego systemu obronnego organizmu przez wr i rft, w skład którego wchodzi m.in. GSH, prawdopodobnie indukuje stres oksydacyjny, zapoczątkowujący uszkodzenia DNA oraz peroksydację lipidów [49]. Niekorzystne skutki oddziaływania flawonoidów mogą wynikać z ich właściwości prooksydacyjnych ujawniających się w pewnych warunkach reakcji m.in.: w obecności jonów metali przejściowych. Flawonole zawierające katecholowe lub pirogallolowe ugrupowanie w pierścieniu B mogą ulec autooksydacji w obecności jonów metali przejściowych i generować rft, pomimo wielu niezaprzeczalnych dowodów wskazujących na ich korzystne terapeutyczne właściwości. Wydaje się jednak, że aktywność prooksydacyjna flawonoli jako wynik procesów autooksydacji nie ma dużego znaczenia *in vivo*, ze względu na to, iż jony metali w organizmie pozostają w stanie związanym [50].

Badania prowadzone przez Ohshimę i współpracowników wykazały, iż flawonoidy posiadające orto-trihydroksylowe ugrupowanie w pierścieniu B (myricetyna, galusan epigallokatechiny, delfinidyna) lub A (baikaleina) wykazują wysoką aktywność prooksydacyjną w obecności NO prowadząc do uszkodzenia DNA [51]. Natomiast zastosowanie w modelu badawczym samego NO albo flawonoidu bez dodatku NO nie prowadziło do uszkodzeń nici DNA. Autorzy zaproponowali następujący mechanizm reakcji:

- 1) NO reaguje z tlenem prowadząc do powstania NO_x , które utleniają związki z ugrupowaniem katecholowym prowadząc do ich pochodnych chinonowych,
- 2) $O_2^{\cdot-}$ może być generowany przez układ chinon/hydroksychinon,
- 3) NO reaguje z $O_2^{\cdot-}$ bardzo szybko prowadząc do powstania $ONOO^-$.

Prooksydacyjne właściwości określonych flawonoidów w obecności NO prawdopodobnie związane są z generowaniem reaktywnych form azotu w wyniku reakcji NO z semichinonowymi/chinonowymi pochodnymi flawonoidów.

1.6. Właściwości przeciwutleniające wybranych kwasów fenolowych

Pochodne kwasu hydroksycynamonowego są bardzo szeroko rozpowszechnione w roślinach. Wykazano, że mogą działać przeciwutleniająco przede wszystkim jako zmiatacze wolnych rodników, co związane jest z ich zdolnością do oddawania protonu i tworzenia w wyniku tej reakcji stabilnego i mało reaktywnego rodnika fenoksyłowego. Tworzą one przede wszystkim estry z kwasami organicznymi oraz z glikozydami [52]. Jak wskazują doniesienia literaturowe, estryfikacja kwasu kawowego węglowodanem prowadzi do obniżenia jego właściwości przeciwutleniających [53]. Chen i Ho dowiedli, że kwas chlorogenowy wykazał niższą aktywność przeciwutleniającą w porównaniu z kwasem kawowym zawartym w oleju kukurydzianym [54]. Kwas kawowy zmiatał rodniki alkoksyłowe powstałe w wyniku rozpadu estrów metylowych kwasu linolowego w oleju słonecznikowym znacznie lepiej w porównaniu z kwasem chlorogenowym. Także kwas kawowy wydajniej zapobiegał utlenianiu lipidów w mięśniach ryb niż kwas chlorogenowy [55]. Z drugiej strony Sroka i Lisowski sugerują, że addycja kwasu chinonowego do kwasu kawowego powoduje wzrost aktywności przeciwutleniającej, ale i zmniejszenie zdolności zmiatania rodników DPPH w porównaniu z samym kwasem kawowym [56]. Cheng, Dai i Zhou wykazali, iż oba kwasy w równym stopniu zapobiegają peroksydacji LDL *in vitro* [57]. Badania prowadzone przez Marinovą wykazały, iż aktywność przeciwutleniająca obu kwasów podczas utleniania triacylogliceroli w oleju słonecznikowym silnie zależy od stężenia obu przeciwutleniaczy. Zastosowanie obu kwasów w stężeniu $2,8 \times 10^{-4}$ M pozwoliło udowodnić, że oba posiadają zbliżoną aktywność przeciwutleniającą. Natomiast zastosowanie obu kwasów w stężeniach powyżej 10×10^{-4} M ujawniło, iż to kwas kawowy jest o wiele efektywniejszym inhibitorem reakcji niż kwas chlorogenowy. Wyjaśnieniem tego zjawiska mogą być specyficzne interakcje między kwasem i wodoronadtlenkami, a także możliwość udziału wolnorodnikowych pochodnych kwasu chlorogenowego w więcej niż jednej reakcji propagacji, kiedy to wolnorodnikowe pochodne kwasu kawowego uczestniczą tylko w jednej [58].

Rodzina kwasów chlorogenowych obejmuje estry *trans* cynamonowych kwasów oraz kwasu chinowego i stanowi dominującą frakcję polifenoli w kawie, truskawkach,

jabłkach, słoneczniku i jagodach. Aktywność przeciwutleniająca tych związków przejawia się przede wszystkim w ich zdolności do zmiatania wolnych rodników, kompleksowania jonów metali przejściowych. Mogą one również zmniejszać absorpcję glukozy i modulować ekspresję genów enzymów przeciwutleniających [59,60]. Przypuszcza się także, iż mogą one chronić paraoksonazę (PON1) obecną w HDL przed inaktywacją wywołaną chlorowaniem. Badania prowadzone przez Gugliucci i współpracowników wykazały, iż kwasy te są przyswajalne przez organizm człowieka. Po konsumpcji kawy w surowicy krwi człowieka zidentyfikowano osiem izomerów kwasu chlorogenowego. Badania wykazały, iż stężenie 5 $\mu\text{mol/l}$ 5-CQA (5-kawoilochinowy) pozwala na 60% ochronę aktywności PON1 przed inaktywacją spowodowaną przez podchloryn (HOCl/OCl^-) w stężeniu 50 $\mu\text{mol/l}$, a całkowitą protekcję osiągnięto dla wyższych stężeń kwasu [61].

Choć wykazano, że wiele roślin może być źródłem kwasu chlorogenowego (kawa, jabłko, truskawki, jagody), wydaje się, iż poszukiwanie nowych źródeł tych związków ze względu na ich szerokie fitoterapeutyczne działanie jest jak najbardziej uzasadnione. Autorzy więc zwracają uwagę na to, iż herbata maté, spożywana na szeroką skalę w Ameryce Południowej zawiera wysokie stężenie kwasu chlorogenowego (6 $\mu\text{mol/l}$) i wykazuje właściwości przeciwutleniające *in vitro* i *in vivo*. Badania sugerują, iż chlorowanie HDL może wpływać na obniżenie aktywności PON1, a kwasy chlorogenowe mogą znosić szkodliwe efekty działania HOCl/OCl^- na paraoksonazę, a co za tym idzie oddziaływać ochronnie na układ sercowo-naczyniowy.

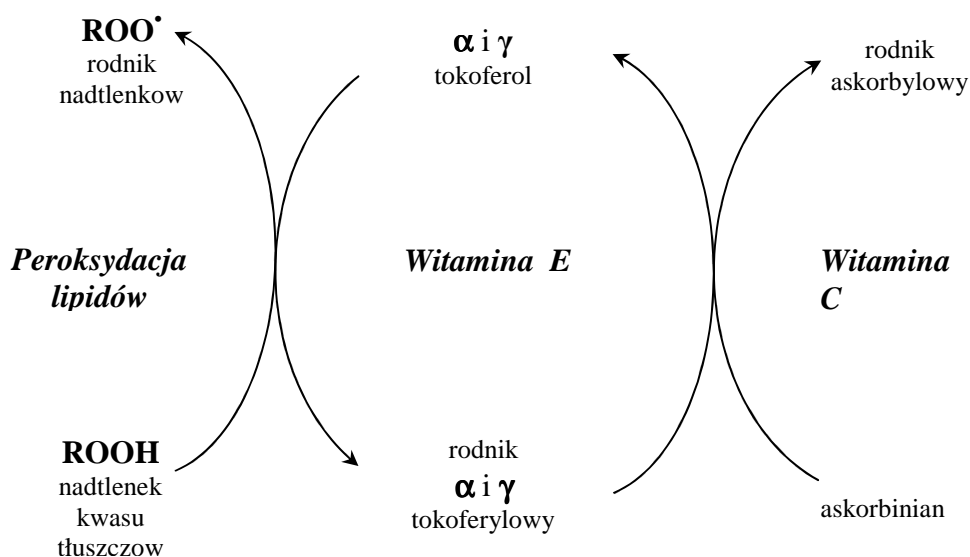
2. Współdziałanie przeciwutleniaczy egzogennych i endogennych

Wysoce wyspecjalizowany enzymatyczny system obronny organizmu, w skład którego wchodzi wewnątrzkomórkowa (Cu,Zn-SOD) oraz mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa (Mn-SOD), wewnątrzkomórkowa, żołądkowo-jelitowa i osoczowa peroksydaza glutationowa (GPx), oraz katalaza (CAT), wspomagany jest również przez metalotioneinę, albuminę, ceruloplazminę (Cp) oraz przeciwutleniacze niskocząsteczkowe takie jak glutation, kwas moczowy, melatonina i bilirubina.

2.1. Witamina E i C

Ochrona organizmu przed reaktywnymi formami tlenu często wiąże się ze współdziałaniem przeciwutleniaczy hydrofobowych z hydrofilowymi, a także współpracą enzymów przeciwutleniających z przeciwutleniaczami małocząsteczkowymi oraz przeciwutleniaczy endogennych z egzogennymi [62].

Przykładem współpracy przeciwutleniaczy hydrofobowych i hydrofilowych jest zdolność regeneracji rodnika tokoferylowego przez askorbinian. Bruno i współpracownicy wykazali, iż przyspieszony ubytek stężenia α - i γ -tokoferolu w organizmie palacza jest wynikiem stresu oksydacyjnego [63]. Zapotrzebowanie na obie witaminy u palaczy jest dużo większe w porównaniu z osobami niepalącymi. Podawanie palaczom witaminy C w dawce 500 mg przez 2 tygodnie znacznie spowolniło proces utraty witaminy E (odpowiednio o 25% dla α -tokoferolu i 45% γ -tokoferolu). Obserwacje te potwierdzają hipotezę, iż kwas askorbinowy regeneruje rodnik tokoferylowy do tokoferolu przedłużając w ten sposób jego okres półrozpadu. Dzięki ułożeniu grupy chromanowej cząsteczki tokoferolu na granicy faz możliwe jest jej oddziaływanie z askorbinianem obecnym w fazie wodnej (rycina 6).



Ryc. 6. Współdziałanie witaminy C i E w zmiataniu wolnych rodników.

2.2. Witamina E i Se

Właściwości przeciwutleniające selenu uwarunkowane są przede wszystkim jego rolą jako niezbędnego składnika centrum aktywnego peroksydazy glutationowej [64]. Wskazuje się także na zdolność Se do regeneracji witaminy E w układach biologicznych. Wykazano bowiem, iż wzbogacanie mięsa mieszaniną witaminy E i Se w celu zahamowania procesów oksydacyjnych, a w konsekwencji stabilizacji barwy, jest bardziej efektywne niż samą witaminą E czy Se [65]. Postuluje się, że Se i witamina E mogą odgrywać istotną rolę w zapobieganiu raka prostaty. Badania prowadzone w ramach projektu *The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Trial* wykazały, że podawanie 50 jednostek witaminy E dziennie spowodowało statystycznie istotne obniżenie ryzyka wystąpienia raka prostaty u palaczy [66]. Natomiast takiej zależności nie stwierdzono w ramach programu *The Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Trial* mimo podawania witaminy E w jeszcze większej dawce 400 IU. Należy zadać sobie pytanie czy palenie papierosów nie jest jednak czynnikiem ograniczającym właściwości prewencyjne witaminy i czy nie są one silnie skorelowane z jej dawką. Dowodem wskazującym na silne właściwości prewencyjne Se są wyniki uzyskane w *The Nutritional Prevention of Cancer (NPC) Trial*, świadczące o 52% obniżeniu ryzyka wystąpienia raka prostaty u mężczyzn, którzy przyjmowali 200 µg Se/dzień średnio przez 6,4 lat. W ramach projektu *VITamins And Lifestyle (VITAL)* mającego na celu ocenę wpływu suplementacji witaminy E i Se na obniżenie ryzyka wystąpienia raka prostaty, uzyskano odwrotną zależność między suplementacją witaminy E oraz stopniem zaawansowania choroby zaobserwowaną tylko w grupie niepalących oraz byłych palaczy. Podobnej zależności nie stwierdzono w odniesieniu do selenu. Rozbieżne wyniki uzyskane w różnych projektach badawczych sugerują, iż wielkość dawki witaminy E nie jest bez znaczenia i może ona odgrywać decydującą rolę. Ustalenie korzystnej dawki wydaje się bardzo zasadne także z powodu literaturowych doniesień wskazujących na niekorzystne oddziaływanie witaminy E w dawkach powyżej 400 IU [67,68]. Trudność w porównywaniu wyników badań oceniających wpływ witaminy E spożywanej z dietą oraz suplementowaną na różne schorzenia związana jest z różnicą w stosowanych stężeniach, a także z jej przyswajalnością. Podobnie jest z Se, gdyż mimo wielu źródeł tego pierwiastka w pożywieniu (zboża, produkty mleczne, jaja, drób, ryby), trudno jest ocenić stężenia, w jakich zostaje on przyswojony przez organizm. Utrudnienia te są ściśle

związane z różnicami w jego zawartościach w glebach i wodach całego świata, a co za tym idzie w pożywieniu.

2.3. SOD i Cp

Warto również wspomnieć o współdziałających ze sobą enzymach katalizujących rozkład reaktywnych form tlenu. Istotne są nie tylko korzyści dla organizmu wynikające ze współdziałania SOD i enzymów rozkładających generowane w organizmie rft, ale i wzajemne uzupełnianie się w sytuacji wzmożonego wykorzystania czy zmniejszonej syntezy białka enzymatycznego. Iskra [69] wykazała, iż niedokrwienie umiarkowane oraz krytyczne kończyn dolnych u mężczyzn z miażdżycą tętnic wywiera wpływ na aktywność ceruloplazminy, stężenie Cu w surowicy [Tabela 1] oraz aktywność Cu,Zn-SOD w erytrocytach [Tabela 2]. Wzrost aktywności ceruloplazminy oraz stężenia Cu w porównaniu z grupą kontrolną związany jest reakcją ostrej fazy towarzyszącą stanowi zapalnemu w niedokrwieniu krytycznym. Aktywność Cu,Zn-SOD w erytrocytach również wzrasta, ale tylko w przypadku niedokrwienia umiarkowanego. Nagły spadek aktywności tego enzymu w niedokrwieniu krytycznym prawdopodobnie związany jest ze zwiększonym wykorzystaniem i niewystarczającą syntezą tego enzymu. W związku ze wzrastającą aktywnością ceruloplazminy w obu stopniach niedokrwienia w porównaniu z grupą kontrolną, można przypuszczać, iż w niedokrwieniu krytycznym to właśnie ceruloplazmina przejmuje rolę głównego przeciwutleniacza we krwi.

Grupa	Aktywność oksydazowa Cp $U \cdot dm^{-3}$	Cu w surowicy $\mu mol \cdot dm^{-3}$	Cu w ścianie tętniczej $\mu g/g$ suchej tkanki
MT n=32	*190±41	*24.6±4.9	*6.8±2.6
TA n=26	125±35	28.6±4.5	4.3±1.7
Grupa kontrolna n=12	123±18	16.3±1.8	3.0±1.1 n=10

*- istotna różnica w porównaniu z grupą kontrolną, $p \leq 0,05$

Tabela 1. Aktywność oksydazowa ceruloplazminy (Cp) w surowicy oraz stężenia miedzi w surowicy i ścianie tętniczej mężczyzn z miażdżycą tętnic (MT), tętniakami aorty (TA) oraz w grupie kontrolnej [69].

Grupa	Cu,Zn-SOD $U \cdot g^{-1} Hb$	Cp $U \cdot dm^{-3}$	Cu $\mu mol \cdot dm^{-3}$
Niedokrwienie krytyczne n=14	2056±872	*,**194±52	*,**23.5±4.2
Niedokrwienie umiarkowane n=12	*2657±35	*139±35	*18.5±2.0
Grupa kontrolna n=12	1205±353	123±18	16.3±1.8

*- istotna różnica w porównaniu z grupą kontrolną, $p \leq 0,05$

**-istotna różnica między krytycznym i umiarkowanym niedokrwieniem, $p \leq 0,05$

Tabela 1. Aktywność Cu,Zn-SOD w erytrocytach oraz aktywność oksydazowa ceruloplazminy (Cp) i stężenie miedzi w surowicy w krytycznym i umiarkowanym niedokrwieniu kończyn dolnych u mężczyzn z MT oraz w grupie kontrolnej [69].

2.4. Związki polifenolowe i enzymy przeciwutleniające

Enzymatyczny system przeciwutleniający wspomagany jest również przez polifenole. Wykazano bowiem, że kurkumina i kwercetyna powodują wzrost aktywności GPx, SOD, CAT *in vivo i in vitro* [70,71]. Molina i współpracownicy [72] zaobserwowali, że długotrwałe podawanie etanolu (5 g/kg masy ciała) myszom spowodowało znaczący wzrost stężenia utlenionego glutationu (GSSG) oraz wzmagало proces peroksydacji lipidów, przy równoczesnym obniżeniu aktywności CAT, SOD i GPx. Okazuje się, że proces uszkodzenia wątroby inicjowany przez etanol może mieć podłoże wolnorodnikowe [72]. Suplementacja kwercetyny przez podawaniem etanolu wpłynęła na wzrost aktywności CAT i GPx. Zaobserwowano również wzrost poziomu GSH, spadek stężenia produktów peroksydacji lipidów oraz zmniejszenie poziomu GSSG. Choć mechanizm współdziałania kwercetyny i GPx nie jest poznany, przypuszcza się, iż jest to wynik współdziałania obu przeciwutleniaczy, czego potwierdzeniem może być wzrost poziomu GSH silnie związany ze podawaniem kwercetyny oraz indukowanie wzrostu aktywności GPx przez glutation. Sugeruje się również, że kwercetyna może przerywać ciąg reakcji wolnorodnikowych w warstwie lipidowej błony komórkowej, a także chelatować jony metali przejściowych zapobiegając inicjowanym przez nie reakcjom generującym wolne rodniki. Takiej zależności nie zaobserwowano u myszy, którym kwercetynę podawano dopiero po spożyciu etanolu.

Duże ilości rft generowane są w momencie reperfuzji i w ciągu kilku pierwszych minut po tym zdarzeniu. Uszkodzenia białek, lipidów i kwasów nukleinowych będące wynikiem

tego procesu stwierdzono przede wszystkim w takich narządach jak serce, jelito, nerka i wątroba [70]. Wykazano, że enzymy przeciwutleniające (SOD, CAT) mogą znacznie zmniejszać, a nawet zapobiegać uszkodzeniom tych narządów w wyniku niedokrwienia/reperfuzji, co ma ogromne znaczenie przy transplantacji narządów. Ekspresja tych enzymów, a także ich aktywność w tkankach, może być zwiększona przez kurkuminę. Ten polifenol pochodzenia roślinnego, główny składnik kurkumy, może spowalniać proces peroksydacji lipidów, obniżać stężenie dialdehydu malonowego (MDA) co sugeruje, iż wpływa ona na wzrost aktywności enzymów przeciwutleniających w wątrobie po jej uszkodzeniu w wyniku niedokrwienia/reperfuzji.

Badania prowadzone przez Fki i współpracowników miały na celu ocenić wpływ ekstraktu uzyskanego z odpadów pochodzących z przetwarzania oliwek na gospodarkę lipidową szczurów [73]. Ekstrakt ten, bardzo bogaty w związki fenolowe, podawano szczurom, a następnie oceniano profil lipidowy, aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy w wątrobie. Hipercholesterolemia wywołana u szczurów nieprawidłową dietą objawiała się przede wszystkim podwyższonym stężeniem całkowitego cholesterolu (TC) oraz LDL-cholesterolu (LDL-C) w surowicy. Wykazano, iż podawanie ekstraktu z oliwek w dawce 10 mg/kg masy ciała spowodowało znaczący spadek stężenia TC i LDL-C oraz wzrost HDL-C. Co więcej, zaobserwowano znaczące zmniejszenie stężenia MDA w wątrobie, nerkach, sercu i aorcie po podaniu ekstraktu. Zaobserwowano również wzrost aktywności katalazy i dysmutazy w wątrobie. Wydaje się więc, że zmniejszenie stężenia cholesterolu we krwi przez ekstrakt z oliwek może być związane z jego zdolnością do spowalniania procesu peroksydacji lipidów oraz współdziałania z enzymami przeciwutleniającymi.

3. Ceruloplazmina

Ceruloplazmina (Cp) jest główną miedzioproteiną osocza, transportującą około 95% jonów miedzi obecnych w zdrowym organizmie człowieka [74]. Pierwszy raz została wyizolowana z frakcji α -2-globulin ludzkiej surowicy przez Holmberga i Laurella [75]. Odpowiedzialna jest przede wszystkim za transport jonów miedzi Cu(II), modulowanie krzepnięcia krwi i angiogenezy, regulację poziomu amin biogennych. Jedną z najważniejszych funkcji Cp jest jej aktywność ferroksozydazowa i wynikające z niej ochronne działanie przeciw negatywnym skutkom stresu oksydacyjnego [76].

Na uwagę zasługują również doniesienia literaturowe wskazujące na aktywność prooksydacyjną Cp oraz wyniki badań epidemiologicznych sugerujące, iż jej podwyższone stężenie w osoczu jest ściśle powiązane z występowaniem chorób układu sercowo-naczyniowego [77,78].

Ceruloplazmina zaliczana jest do grupy białek niebieskich, w skład której wchodzi również roślinne lakkazy, roślinna oksydaza askorbinowa czy oksydaza bilirubinowa. Cechą charakterystyczną tych białek jest obecność kilku centrów miedziowych, klasyfikowanych ze względu na ich rolę i właściwości spektroskopowe [74,79,80].

Uwzględniając procentową zawartość miedzi oraz masę cząsteczkową Cp, przyjmuje się, że cząsteczka Cp ssaków zawiera 6-7 jonów miedzi Cu(I)/(II) [81]. Wykazano, iż około 40-50% z nich daje charakterystyczny sygnał w elektronowym rezonansie paramagnetycznym (EPR). W oparciu o kryterium uwzględniające różnice w emisji sygnału EPR zaproponowano podział jonów miedzi na typ 1 i 2 [82]. Typ 1 charakteryzuje się przede wszystkim intensywną absorpcją przy $\lambda=610$ nm, co jest przyczyną bardzo silnego niebieskiego zabarwienia związanego z przejściem elektronowym między siarką cysteiny a miedzią typu 1 [83]. Wielu badaczy wykazało kinetyczną i spektroskopową nierównowagę jonów Cu typu 1. Jeden z podtypów, tzw. 1a, wykazuje zdolność do bardzo szybkiej reoksydacji i jest pierwotnym akceptorem elektronów z utlenianego substratu. Natomiast podtyp 1b ulega bardzo wolnej reoksydacji trwającej kilka minut [84]. Podtypy te różnią się także położeniem szczytów w widmach EPR oraz wartościami potencjałów redoks. Centrum miedziowe typu 2 nie wykazuje optycznej absorpcji, ale posiada właściwości paramagnetyczne i w związku z tym charakterystyczne widmo EPR. Jon miedzi typu 2 znajduje się wraz z 2 jonami miedzi typu 3 we wspólnej 'kieszeni' tworząc trójczłonowe miejsce odpowiedzialne za wiązanie cząsteczki tlenu i jej redukcję [85]. Charakterystyczną właściwością Cu typu 2 jest duże powinowactwo do wiązania CN^- , N_3^- , F^- , będących inhibitorami aktywności oksydazowej Cp. Wykazano, iż centrum miedziowe typu 3 jest diamagnetyczne, ma najwyższy potencjał redoks, działa jako dwuelektronowy akceptor lub donor i jest niezbędne do redukcji cząsteczki tlenu [86]. Wykazano, że jedną z najważniejszych funkcji biologicznych Cp jest jej zdolność do redukowania tlenu do wody. Redukcja ta wymaga przeniesienia 4 elektronów na cząsteczkę tlenu. Aby możliwy był wewnątrzcząsteczkowy transfer elektronów, wszystkie centra miedziowe położone są blisko siebie, co pozwala na pobieranie elektronów z substratu przez jon Cu typu 1, potem Cu typu 2 i dalej jony Cu typu 3, które wiążą i redukują tlen. Postuluje się,

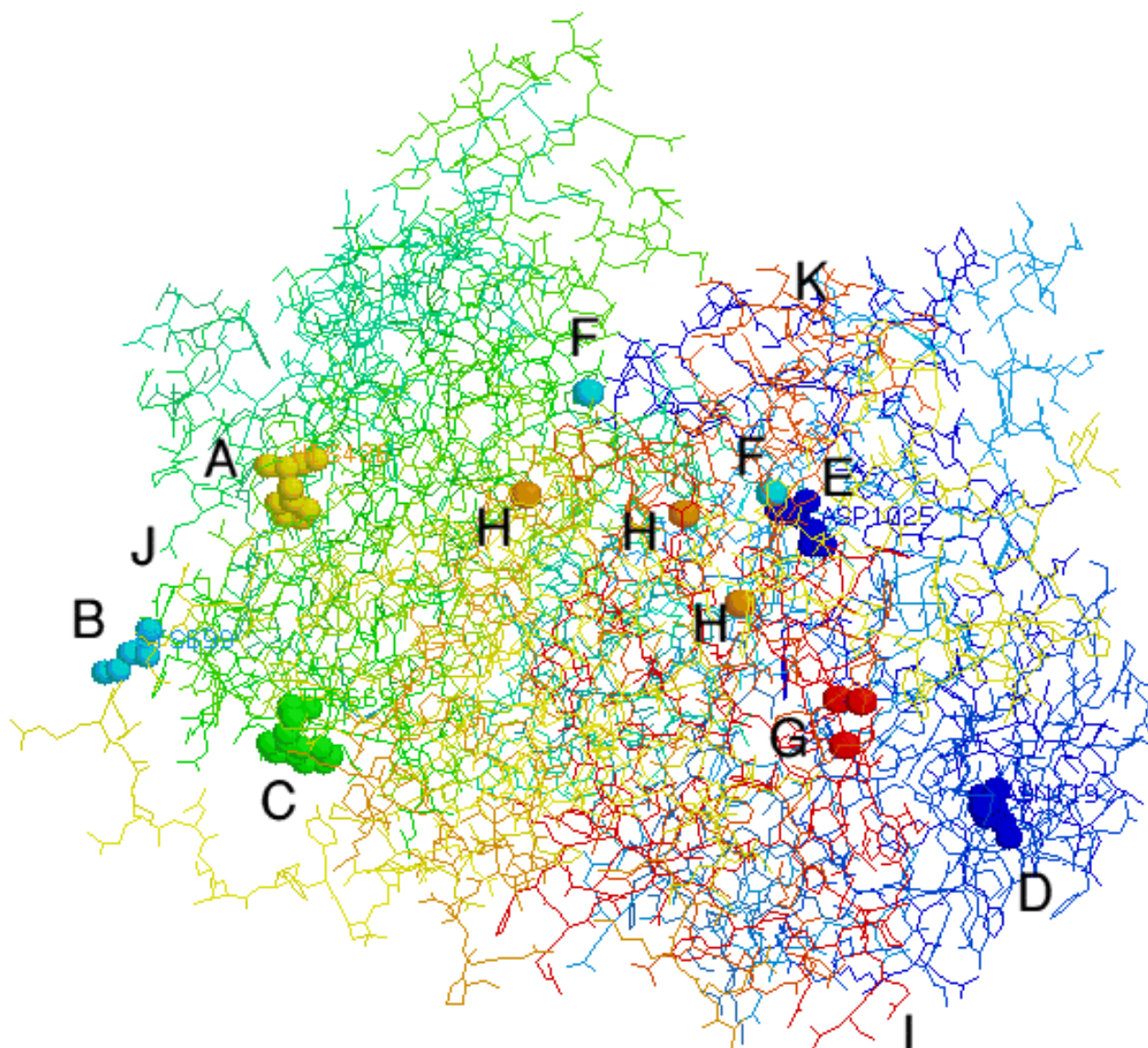
że cząsteczka Cp człowieka zawiera 3 jony Cu typu 1, 1 jon miedzi typu 2 i 2 jony Cu typu 3.

Ceruloplazmina jest największą poznaną oksydazą, zawierającą 1046 reszt aminokwasowych formujących pojedynczy łańcuch polipeptydowy o masie 132 kDa. Badania krystalograficzne wykazały, iż Cp zbudowana jest z 6 „ β -beczułkowych” domen, układających się w trójkątny szys [79] (rycina 7). Jony miedzi typu 1 znajdują się w domenach 2, 4 i 6, natomiast trzy jony miedzi w trójdzeniowym klasterze leżą na granicy domeny 1 i 6. Jony miedzi typu 1 zlokalizowany są blisko C-terminalnego końca każdej z trzech domen. W ich wiązaniu uczestniczą dwie histydyny, cysteina oraz metionina. Ligandami wiążącymi jon Cu w centrum typu 2 i 3 są cztery pary reszt histydyny [79].

Badania krystalograficzne potwierdziły obecność jeszcze dwóch miejsc wiążących labilny jon miedzi. Przypuszcza się, że jon ten oraz reszta histydyny His⁴²⁶ są odpowiedzialne za aktywność prooksydacyjną Cp [79]. Sugeruje się, że labilny jon miedzi może ulegać redukcji i dalej reoksydacji przez tlen lub inne utleniacze, równocześnie generując rft.

Cp odgrywa ważną rolę w metabolizmie tlenku azotu, gdyż wykazano, że sprzyja tworzeniu nitrozotiole, w tym S-nitrozoglutationu. Nitrozotiole pełnią bardzo ważną rolę w transporcie, przechowywaniu i metabolizmie NO, który za ich pośrednictwem może być przekazywany między cząsteczkami białek w reakcji transnitrozylacji. Rolą ceruloplazminy w tym procesie jest utlenianie NO uwolnionego przez komórki do NO⁺, bardziej reaktywnej cząsteczki niż NO, w stosunku do tioli. NO po przyłączeniu do niebieskich centr miedziowych, tworzy NO⁺ przy równoczesnej redukcji jonu Cu(II). Wiążąc się z grupą tiolową NO tworzy addukt nitrozotiolowy biorący udział w przekazywaniu sygnałów między- i wewnątrzkomórkowych.

W domenie 1 znajduje się miejsce wiązania dietyloamidu kwasu lizergowego, znanego jako modulator aktywności oksydazowej Cp w stosunku do amin biogennych.



Ryc. 7. Struktura ceruloplazminy.

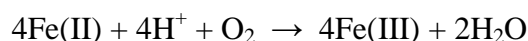
A: miejsce odpowiedzialne za aktywność prooksydacyjną, **B:** miejsce odpowiedzialne za aktywność peroksydazową, **C:** miejsce odpowiedzialne za reakcję z p-difenyloaminą
D: miejsce wiązania dietyloamidu kwasu lizergowego (LSD), **E, K:** miejsce wiązania jonów Fe(II), **F:** miejsce wiążące labilne jony miedzi, **G:** tryplet miedziowy (typ 2 i 3),
H: centrum typu 1, **I, J:** miejsce wiązania NO.

<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/caeruloplasmin/caeruloplasmin/index.htm>

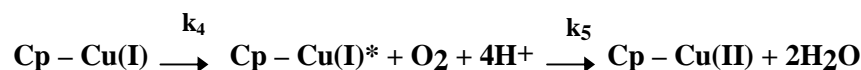
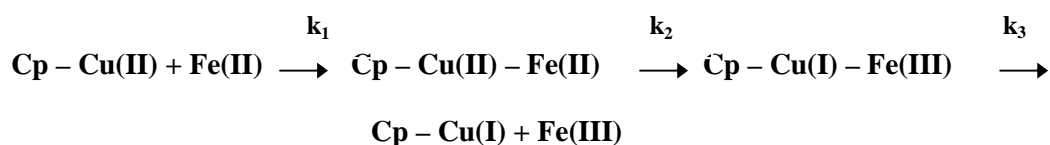
Główną rolą ceruloplazminy w organizmie jest transport jonów miedzi do wszystkich tkanek [87, 88]. Ze względu na zdolność oddawania i przyjmowania elektronów, jon Cu(II) wchodzi w skład oksydoreduktaz i bierze udział w reakcjach typu redoks. Katalizuje utlenianie amin biogennych i związków o charakterze fenoli, nie generując równocześnie rft. Cp zaangażowana jest w degradację neurotransmiterów, takich jak noradrenalina i 6-hydroksydopamina. Dzięki aktywności ferroksoydazowej hamuje proces peroksydacji lipidów, białek i DNA [74].

Badania prowadzone przez zespół Friedena wykazały, że Cp jest istotnym pomostem łączącym metabolizm Cu i Fe. Stwierdzono, iż Cp może mobilizować jony żelaza z miejsc ich składowania, w szczególności z wątroby *in vivo*. Właściwość tę potwierdziło wiele zespołów badawczych. Udowodniono, iż Cp wykazuje zdolność do utleniania Fe(II) umożliwiając tworzenie kompleksu Fe(III)-transferyna. Mechanizm tej reakcji zaproponowali Frieden i Hsieh w 1976 roku zakładając, że Fe(III) uwolnione z ferrytyny może ulec redukcji do Fe(II), a po ponownym utlenieniu do Fe(III) przez Cp może łączyć się z apotransferyną i w tej postaci być dostarczone do komórek [89]. Regulacja metabolizmu żelaza poprzez utlenianie jonów Fe(II) do Fe(III), które następnie wiązane są przez transferynę i ferrytynę, zapobiega tworzeniu wolnych rodników w organizmie. U pacjentów z brakiem ceruloplazminy (aceruloplazminemia), wykazano, iż żelazo kumuluje się w mózgu, wątrobie i trzustce, co może prowadzić do cukrzycy i demencji [90]. W schorzeniu tym wewnątrzkomórkowa homeostaza jonów miedzi wydaje się być nienaruszona, co nie jest zaskakujące z powodu wielu funkcji, jakie pełni ten pierwiastek i ścisłej kontroli, jakiej podlega jego przepływ do wnętrza komórek [91].

Zmniejszenie puli wolnych jonów żelaza w osoczu przez Cp ogranicza ich udział w generowaniu wolnych rodników i reaktywnych form tlenu w reakcji Fentona i Habera-Weissa [92, 93]. W przypadku reakcji katalizowanej przez Cp następuje 4-elektronowa redukcja tlenu i utlenianie jonów Fe(II):



Reakcja ta odbywa się w dwóch etapach, utleniania Fe(II) oraz Cu(I) w cząsteczce Cp:



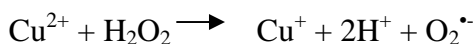
Cp zaliczana jest do grupy białek ostrej fazy, ponieważ w wyniku infekcji i stanów zapalnych jej stężenie wzrasta, co związane jest z odpowiedzią organizmu na stres oksydacyjny.

W przeciwieństwie do wspomnianych wyżej ochronnych właściwości ceruloplazminy, zwraca się również uwagę, iż wzrost stężenia Cp jest ściśle związany z chorobami sercowo-naczyniowymi.

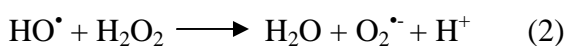
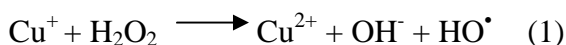
Ceruloplazmina obok haptoglobiny, fibrynogenu, białka C-reaktywnego (CRP), kwaśnej α_1 -glikoproteiny i α_1 - antytrypsyny zaliczana jest do grupy białek ostrej fazy [94,95]. Od kiedy potwierdzono, iż stan zapalny jest ważnym czynnikiem determinującym rozwój chorób sercowo-naczyniowych, uzasadnione jest sugestia, iż to Cp mogłaby być również takim czynnikiem [96]. Podwyższone stężenia wyżej wymienionych białek wiążą się również ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych u osób z hypercholesterolemią, nadciśnieniem tętniczym, u palących papierosy i chorych na cukrzycę. Podwyższone stężenia Cp i miedzi oznaczono również u pacjentów z zawałem mięśnia sercowego i niestabilną dusznicą bolesną [74]. Manttari i współpracownicy zaobserwowali zwiększone ryzyko wystąpienia choroby wieńcowej serca u osób z podwyższonym stężeniem Cp i cholesterolu we frakcji LDL oraz obniżonym we frakcji HDL [97].

Dane dotyczące udziału miedzi w patogenezie miażdżycy są sprzeczne. Badania prowadzone wśród fińskiej populacji także wykazały, iż podwyższone stężenie Cu(II) w surowicy może być niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia choroby niedokrwiennej serca [98]. Z drugiej strony niskie stężenie miedzi w surowicy krwi towarzyszy podwyższonemu całkowitemu stężeniu cholesterolu i sprzyja gromadzeniu produktów peroksydacji lipidów w ścianie tętniczej, co tłumaczy się zmniejszoną aktywnością Cu,Zn-SOD. Niedobór jonów miedzi może również w znaczący sposób upośledzać homeostazę żelaza [99]. Sugeruje się, iż zarówno obniżone jak i podwyższone stężenie miedzi może wpływać na rozwój miażdżycy tętnic.

Sugeruje się, że jony miedzi, podobnie jak jony żelaza, zwłaszcza w formie niezwiązanej, mogą katalizować reakcje prowadzące do tworzenia rft [100]. Wolne jony Cu(II), podobnie jak jony Fe(II) mogą katalizować generowanie $O_2^{\bullet-}$ w reakcji z H_2O_2 [101]:



zaś jony Cu^+ mogą generować HO^{\bullet} w reakcji Fentona (1). Rodnik ten powoduje następnie tworzenie $O_2^{\bullet-}$ (2) redukującego w kolejnej reakcji Cu^{2+} (3) [101]:



U zdrowych osób stężenie wolnych jonów miedzi jest bardzo małe, bowiem niemal cała pula jest związana z Cp, albuminą lub z innymi niskocząsteczkowymi ligandami [87]. Sugeruje się jednak, iż część jonów miedzi obecnych w białkach może być z nich uwalniana [102]. Musci i współpracownicy wykazali, że 50% jonów miedzi związanych z Cp jest labilne lub może ulec chelatowaniu [103]. Znaczące wydaje się również to, że rft mogą wpływać na oddysocjowanie jonów miedzi z Cp lub innych białek wiążących, zmieniać strukturę i funkcję Cp, wykazano bowiem, iż H_2O_2 może powodować zmiany konformacyjne Cp i uwalniać jony miedzi z centrów aktywnych [104]. Uwalnianie jonów miedzi może być również powodowane zmianą strukturalnej spójności Cp z wiekiem. Powstający lokalnie w komórkach śródbłonna naczyń $ONOO^-$ (produkt reakcji między NO i $O_2^{\bullet-}$) także powoduje uwolnienie jonów miedzi z Cp, co prowadzi do utraty aktywności ferroksydazowej enzymu [105]. Łańcuchy boczne cysteiny, tryptofanu, metioniny histydy, tyrozyny i lizyny są szczególnie podatne na utlenianie przez rodniki peroksyłowe [106]. Wydaje się, że utrata aktywności ferroksydazowej Cp oraz uwolnienie jonów miedzi pod wpływem rodników peroksyłowych wynika przede wszystkim z modyfikacji reszt aminokwasowych wchodzących w skład centrów aktywnych i odpowiedzialnych za wiązanie jonów miedzi. Utrata lub obniżenie aktywności ferroksydazowej Cp może prowadzić do kumulacji żelaza w tkankach, a także w blaszkach miażdżycowych [107].

III. CEL PRACY

Jony żelaza Fe(II) pozostając w stanie wolnym mogą generować wolne rodniki i reaktywne formy tlenu. Mimo, iż organizm dysponuje mechanizmami skutecznie przeciwdziałającymi tym szkodliwym czynnikom poprzez działanie głównie ferrytyny, transferyny i ceruloplazminy, od dawna poszukuje się związków, które mogłyby podnieść skuteczność organizmu w eliminowaniu wolnych jonów żelaza zarówno Fe(II) jak i Fe(III). Wiele badań wskazuje, iż to właśnie związki polifenolowe mogą skutecznie wspomagać organizm ograniczając reakcje tworzenia wr i rft katalizowane przez jony żelaza. Jednakże mechanizm ich współdziałania z przeciwutleniaczami endogennymi nie jest wyjaśniony.

Celem podjętych w przedstawionej pracy badań było:

- ocena wpływu ekstraktu z pestek maliny właściwej (*Rubus idaeus*) oraz wybranych kwasów fenolowych na stężenie jonów Fe(II) oraz aktywność ferrokazydazową C_{pK} i C_{pM} w badanym układzie,
- ocena udziału kwasów fenolowych w utlenianiu jonów Fe(II),
- ocena zdolności wybranych kwasów fenolowych do kompleksowania jonów Fe(II),
- wyjaśnienie wpływu proporcji molowej kwas fenolowy:Fe(II), oraz struktury kwasów fenolowych na stężenie jonów Fe(II) w badanych układach.

IV. WYKAZ ODCZYNNIKÓW

NaCl – chlorek sodu

KH_2PO_4 - diwodoroortofosforan (V) potasu

$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$ – kwas 6-aminokapronowy

CH_3COOH – kwas octowy

CH_3COONa – octan sodu

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – siarczan (VI) amonu

$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – sól Mohra

K_2HPO_4 – wodorofosforan (V) potasu

apotransferyna

chloroform

etanol

ferrozyna - sól sodową kwasu 3-(2-pirydylo)-5,6-difenylo-1,2,4-triazynylo-4',4'' disulfonowego

heksan

histydyna

kwas chlorogenowy

kwas elagowy

kwas ferulowy

kwas kawowy

kwas p-kumarowy

kwas sinapinowy

odczynnik Folina-Ciocalteau - przygotowywany przez zmieszanie Na_2WO_4 , Na_2MoO_4 , Li_2SO_4 , wody bromowej oraz stężonych kwasów HCl i H_3PO_4

Cp_M – ceruloplazmina wyizolowana z osocza chorych z PMNT

Cp_K – ceruloplazmina wyizolowana z osocza krwiodawców

woda ultraczysta - (Millipore Simplicity, $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$), przefiltrowana dodatkowo przez filtry o średnicy $0,45 \mu\text{m}$ (regenerowana celuloza) firmy Macherey–Nagel pod próżnią i poddana działaniu ultradźwięków

V. MATERIAŁ I METODY

1. Izolacja i oczyszczanie ceruloplazminy

1.1. Odczynniki

- NaCl, chloroform, DEAE-Sephadex A-25, etanol, kwas 6-aminokapronowy, CH₃COONa, (NH₄)₂SO₄ - Sigma-Aldrich
- KH₂PO₄, K₂HPO₄, CH₃COOH - POCh

1.2. Procedura

Materiał do badań stanowiły próby osocza chorych z przewlekłą miażdżycową niedrożnością tętnic kończyn dolnych (PMNT), leczonych operacyjnie w Klinice Chirurgii Ogólnej i Naczyń Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, ul. Długa ½ oraz osocza krwiodawców z Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu, ul. Marcelińska 22.

W celu izolacji ceruloplazminy (Cp) przeprowadzono adsorpcję białek nanosząc na uformowaną kolumnę z żelem DEAE-Sephadex A-25, zrównoważoną buforem fosforanowym (0,05 M; pH 6,82) odpowiednio:

- 200 ml osocza uzyskanego od chorych z PMNT

lub

- 200 ml osocza uzyskanego od krwiodawców

w obecności kwasu 6-aminokapronowego pełniącego rolę inhibitora proteolitycznego. Ceruloplazmina wytworzyła na szczycie kolumny niebieskie pasmo. Następnie przemywano kolumnę buforem fosforanowym (0,08 M; pH 6,82), a Cp wyeluowano a pomocą buforu octanowego (0,2 M; pH 5,5) wraz z 0,125 M NaCl. W kolejnym etapie izolacji usuwano frakcję albumin i w tym celu zastosowano (NH₄)₂SO₄ wykorzystując fakt, iż Cp jako α₂-globulina w warunkach około 50% nasycenia ulega wysoleniu, natomiast albuminy pozostają rozpuszczone w roztworze. Przeprowadzenie selektywnej 3-godzinnej denaturacji roztworu Cp w temperaturze pokojowej, za pomocą mieszaniny etanol/chloroform (v:v, 9:1) w stosunku 1:3, miało na celu dalsze oczyszczenie roztworu Cp. W takich warunkach tylko Cp nie ulega denaturacji w przeciwieństwie do innych białek, które mogą znajdować się w roztworze.

W celu usunięcia chloroformu i etanolu przeprowadzono dializę otrzymanego roztworu Cp wobec NaCl (0,9%; pH 7).

Stopień czystości uzyskanego preparatu oceniono wyznaczając:

- stężenie Cp na podstawie A_{610} nm i A_{280} nm,
- wskaźnik barwny $\cdot A_{610}$ nm / A_{280} nm. Zmierzone absorbancję uzyskanego dializatu przy długości fali 610 oraz 280 nm i otrzymano:

- stężenie Cp wyizolowanej z osocza chorych z PMNT (0,65 mg/ml) (C_{pM}) i Cp uzyskanej od krwiodawców (1,16 mg/ml) (C_{pK}), wskaźnik barwny wynoszący 0,031 dla C_{pM} oraz 0,036 dla C_{pK} .

2. Otrzymywanie ekstraktu z pestek maliny

2.1. Odczynniki

- etanol, heksan - POCh
- odczynnik Folina-Ciocalteau - Sigma-Aldrich

2.2. Procedura

Ekstrakt z pestek maliny właściwej (*Rubus idaeus L.*) (EPM) uzyskany został dzięki współpracy z Katedrą Towaroznawstwa Żywności Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu. Pestki malin otrzymano z odpadów podczas przerobu malin w Zakładzie Przemysłu Owocowo-Warzywnego Kotlin Sp. z o.o.

Podlegały one:

- suszeniu,
- rozdrobnieniu,
- odtłuszczeniu za pomocą heksanu,
- trzykrotnemu ekstrahowaniu z 80% etanolem. Uzyskany ekstrakt

odparowano w temperaturze 45°C, a suchą pozostałość rozpuszczono w 96% etanolu. W badanym ekstrakcie oznaczono całkowite stężenie związków fenolowych metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocalteau [108]. Natomiast stężenia poszczególnych kwasów fenolowych, wolnych i sprzężonych, oznaczono za pomocą techniki HPLC w Katedrze Towaroznawstwa UE w Poznaniu. Analiza składu ilościowego polifenoli w ekstrakcie wykazała, iż dominującą frakcję stanowiły kwasy fenolowe i flawonole. Stężenie związków fenolowych w ekstrakcie wynosiło 2370 mg/100 g s.m. w przeliczeniu na kwas kawowy. Zawartość poszczególnych związków fenolowych w formie wolnej (w) jak i związanej (z) kształtowała się następująco:

- kwas elagowy 7,7 mg/100g s.m. (w); 98,0 mg/100g s.m (z)

- kwas kawowy 0,1 mg/100g s.m. (w); 0,9 mg/100g s.m (z)
- kwas p-kumarowy 0,01 mg/100g s.m. (w); 0,7 mg/100g s.m (z)
- kwas ferulowy 0,1 mg/100g s.m. (w); 0,88 mg/100g s.m (z)
- kwas chlorogenowy 0,05 mg/100g s.m. (w)
- kwas sinapinowy 0,41 mg/100g s.m (z).

3. Pomiar zdolności do eliminowania Fe(II) przez EPM i kwasy fenolowe z układu badanego

3.1. Zasada metody

Jony Fe(II) w postaci kompleksu z histydyną ulegają utlenieniu do Fe(III) przez Cp (aktywność ferrokazydazowa), bądź chelatowaniu lub utlenieniu przez EPM lub wybrane kwasy fenolowe. Pozostałe w roztworze jony Fe(II) tworzą w ustalonym czasie reakcji kompleks z ferrozyną, którego absorbancję mierzy się spektrofotometrycznie przy długości fali 564 nm.

Aktywność ferrokazydazową Cp oraz zdolność EPM i kwasów fenolowych do eliminowania Fe(II) z układu obliczano wykorzystując następujące równanie:

$$\text{stężenie Fe(II)} = (A_C - A_{\text{bad}}) / 27,9$$

i przedstawiono jako zmianę stężenia Δ Fe(II) [$\mu\text{mol/l}$]

gdzie:

A_C – absorbancja próby odnośnikowej

A_{bad} – absorbancja próby badanej

27,9 – molowy współczynnik absorpcji kompleksu ferrozyna:Fe(II) [$\text{l} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

3.2. Pomiar aktywności ferrokazydazowej ceruloplazminy

3.2.1. Odczynniki

- bufor fosforanowy (0,05 M; pH 7,38)

- ferrozyna w buforze fosforanowym (4,0 mM)
- NaCl (50 mM)
- sól Mohra (0,22 mM)
- histydyna (1,1 mM)

3.2.2. Procedura

Aktywność ferroksydazową ceruloplazminy wyizolowanej z osocza krwiodawców i chorych z PMNT mierzono przygotowując roztwory o stężeniach: 22, 33, 44 i 66 mg/l. Objętość mieszaniny reakcyjnej była stała i wynosiła 525 μ l, a uzyskiwano ją każdorazowo poprzez dodanie do roztworu Cp odpowiedniej objętości roztworu NaCl. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w łaźni wodnej przez 1 minutę, a następnie dodawano przygotowany na bieżąco roztwór zawierający kompleks histydyna/ $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ (1:1; v:v). Stężenie jonów Fe(II) w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 71,4 μ M. Po upływie kolejnej minuty z mieszaniny reakcyjnej pobierano 100 μ l roztworu, który dodawano do uprzednio przygotowanej probówki z 900 μ l roztworu ferrozyny. Mierzono absorbancję powstałego kompleksu Fe(II) – ferrozyna przy λ 564 nm (A_{bad}). Równocześnie przygotowano próbę odnośnikową (A_C) zawierającą tylko 525 μ l roztworu NaCl i postępowano jak z próbą zawierającą Cp. Pomiaru aktywności ferroksydazowej Cp dokonano 10 razy dla każdego ze stężeń.

3.3. Badanie wpływu ekstraktu z pestek maliny na aktywność ferroksydazową Cp

W pierwszym etapie badań dokonano pomiaru zdolności EPM do eliminowania Fe(II) z układu. W tym celu przygotowano mieszaniny reakcyjne o różnym stężeniu EPM (1,20 - 36,0 μ g s.m./ml) bez udziału Cp. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 525 μ l, którą uzyskano poprzez dodatek odpowiednich objętości roztworu NaCl. Prowadząc badanie zdolności EPM do eliminowania Fe(II) wykorzystano odczynniki oraz procedurę oznaczenia opisaną w punkcie 3.2.2. Pomiar powtórzono 10 razy dla każdego stężenia EPM.

Aby ocenić wpływ EPM na aktywność ferroksydazową C_{PM} oraz C_{PK} przygotowano następujące mieszaniny reakcyjne, które zawierały: ekstrakt o wybranych stężeniach z zakresu 1,20 – 36,0 μ g s.m./ml i dla każdego z nich C_{PM} lub C_{PK} w zakresie stężeń 22–66 mg/l, C_{PM} lub C_{PK} o wybranym stężeniu z zakresu

22–66	mg/l	i	dla	każdego
-------	------	---	-----	---------

z nich ekstrakt w zakresie stężeń 1,20 – 36,0 µg s.m./ml. Całkowita objętość analizowanych mieszanin reakcyjnych wynosiła 525 µl, którą otrzymywano przez dodatek odpowiednich objętości roztworu NaCl. Prowadząc analizę wpływu ekstraktu na aktywność ferroksydazową Cp wykorzystano odczynniki oraz procedurę oznaczenia opisaną w punkcie 3.2.2. Pomiar powtórzono 8 razy.

3.4. Badanie wpływu wybranych kwasów fenolowych na aktywność ferroksydazową Cp

W pierwszym etapie badań oceniono zdolność kwasów do eliminacji Fe(II) z układu bez udziału Cp. Wybór kwasów fenolowych wynikał z ich obecności i stężenia w EPM oraz cech budowy, w szczególności liczby i rozmieszczenia grup hydroksylowych w ich cząsteczkach, odpowiadających za reakcje z jonami Fe(II).

Analizie poddano:

- kwas kawowy, kwas ferulowy, kwas sinapinowy, kwas p-kumarowy, kwas elagowy, kwas chlorogenowy - Sigma-Aldrich.

Sporządzono wyjściowe roztwory:

- kwasu kawowego w wodzie redestylowanej,
- kwasu ferulowego w wodzie redestylowanej,
- kwasu sinapinowego w 25% metanolu,
- kwasu p-kumarowego w wodzie redestylowanej,
- kwasu elagowego w metanolu,
- kwasu chlorogenowego w wodzie redestylowanej,

z których przygotowano roztwory robocze.

Mieszaniny reakcyjne zawierały poszczególne kwasy fenolowe w zakresie stężeń 2,0 – 17,0 molx10⁻⁵/l. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 525 µl, którą uzyskano poprzez dodatek odpowiednich objętości roztworu NaCl. Prowadząc badania zdolności wybranych kwasów do eliminowania jonów Fe(II) z układu wykorzystano odczynniki oraz procedurę oznaczenia opisaną w punkcie 3.2.2. Pomiar powtórzono 8 razy.

Aby ocenić wpływ wybranych kwasów fenolowych na aktywność ferroksydazową Cp, przygotowano mieszaniny reakcyjne, które zawierały:

- poszczególne kwasy fenolowe o wybranych stężeniach z zakresu 2,0–17,0 molx10⁻⁵/l i dla każdego z nich Cp w zakresie stężeń 22–66 mg/l, Cp o wybranym stężeniu z zakresu 22–66 mg/l i dla każdego z nich kwasy fenolowe w zakresie stężeń 2,0–17,0 molx10⁻⁵/l.

Prowadząc analizę wpływu kwasów fenolowych na aktywność ferroksydazową Cp wykorzystano odczynniki oraz procedurę oznaczenia opisaną w punkcie 3.2.2. Pomiar powtórzono 8 razy.

4. Badanie utleniania jonów Fe(II) w obecności kwasów fenolowych

4.1. Odczynniki

- bufor octanowy (1,2 M; pH 6,0)
- roztwór wodny apotransferyny (2,0 %)
- sól Mohra (0,22 mM)
- roztwory poszczególnych kwasów fenolowych przygotowano jak w punkcie 3.4.
- wszystkie roztwory przygotowano na bazie wody przefiltrowanej przez filtry o średnicy 0,45 μm (regenerowana celuloza) firmy Macherey–Nagel pod próżnią i poddanej działaniu ultradźwięków.

4.2. Zasada metody

Mikrometoda zaproponowana przez Johnsona [109] wykorzystywana jest do oznaczenia stężenia ceruloplazminy w surowicy, w oparciu o reakcję utleniania jonów Fe(II) do Fe(III) przez Cp w określonych warunkach i czasie reakcji. Powstające jony Fe(III) tworzą z apotransferyną pomarańczowy kompleks, którego absorbancję mierzy się spektrofotometrycznie przy długości fali 460 nm. Metodę zastosowano w celu badania zdolności kwasów fenolowych do utleniania jonów Fe(II).

Stężenie kompleksu Fe(III)-transferyna, powstałego po upływie 1 min w odniesieniu do 1 μmol kwasu fenolowego, obliczono ze wzoru:

$$\text{Fe(III)-transferyna} = [(A - A_0) - (C - C_0)] / \varepsilon \cdot t \cdot m \text{ } [\mu\text{M}]$$

gdzie:

A₀ – wartość absorbancji badanego roztworu w czasie t=0 minut
 A – wartość absorbancji badanego roztworu po upływie 1 minuty
 C₀ – wartość absorbancji próby odniesienia w czasie t=0 minut
 C – wartość absorbancji próby odniesienia po upływie 1 minuty

ε – molowy współczynnik absorpcji dla Fe(III)-transferyna, $\varepsilon=0,0025 [(l \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})]$
t – czas trwania reakcji (1 minuta)
m – stężenie kwasu fenolowego [μM]

4.3. Procedura

Badanie zdolności kwasów fenolowych do utleniania jonów Fe(II) przeprowadzono dla dwóch proporcji molowych Fe(II):kwas fenolowy, wynoszących 6:1 (A) oraz 1:1 (B). Badane roztwory przygotowano umieszczając w kuwecie pomiarowej 0,170 ml buforu octanowego, 0,250 ml roztworu apotransferyny, odpowiednią objętość roztworu kwasu fenolowego oraz wodę dla uzyskania objętości 0,700 ml. Po wymieszaniu kuwetę umieszczono w spektrofotometrze na 3 minuty w temperaturze 30°C. Następnie dodawano 0,300 ml roztworu jonów Fe(II) dla uzyskania ich stężenia 71,4 μM i natychmiast mierzono absorbancję (A_0), a następnie po upływie 1 minuty (A). Próba odniesienia zawierała 0,170 ml buforu octanowego, 0,250 ml roztworu apotransferyny i 0,280 ml wody. Jak w przypadku prób badanych, po inkubacji i dodaniu roztworu jonów Fe(II), mierzono absorbancję początkową (C_0) i po upływie 1 minuty (C). Pomiar powtórzono 3 razy.

5. Kompleksowanie jonów Fe(II) przez kwasy fenolowe

5.1. Odczynniki

- roztwory poszczególnych kwasów fenolowych przygotowane jak w punkcie 3.4.
- sól Mohra (0,22 mM)
- roztwory wodne przygotowane na bazie ultra czystej wody przefiltrowanej przez filtry o średnicy 0,45 μm (regenerowana celuloza) firmy Macherey– Nagel pod próżnią i poddanej działaniu ultradźwięków.

5.2. Aparatura

- spektrofotometr HITACHI U-2900

5.3. Zasada metody

Aby ocenić zdolność kwasów do kompleksowania jonów Fe(II) wykonano widma absorpcji w zakresie światła ultrafioletowego i widzialnego (UV-VIS) roztworów zawierających same kwasy fenolowe oraz kwasy wraz z dodatkiem jonów Fe(II).

5.4. Procedura

W pierwszym etapie badań zarejestrowano widma UV-VIS roztworów poszczególnych kwasów fenolowych o 4 różnych stężeniach – $4,3 \times 10^{-6}$, $1,3 \times 10^{-5}$, $4,2 \times 10^{-5}$ i $8,6 \times 10^{-5}$ mol/l. W tym celu do kuwety pomiarowej dodano odpowiednie objętości roztworów kwasów fenolowych i uzupełniono roztworem chlorku sodu do objętości 1 ml.

Natomiast w drugim etapie badań zarejestrowano widma UV-VIS mieszanin reakcyjnych zawierających kwasy fenolowe o tych samych stężeniach, jak w pierwszym etapie badań, wraz z dodatkiem jonów Fe(II). W tym przypadku w kuwetach pomiarowych umieszczono odpowiednie objętości roztworów kwasów fenolowych, 0,500 ml lub 0,750 ml roztworu soli Mohra oraz uzupełniono roztworem chlorku sodu do objętości 1 ml. Taki sposób przygotowania mieszanin reakcyjnych pozwolił uzyskać następujące proporcje molowe kwas fenolowy/jony Fe(II): 0,04; 0,06; 0,13; 0,18; 0,33; 0,41; 0,5; 0,59; 0,67; 0,85; 1,0 oraz 1,21.

Dokonano trzykrotnej rejestracji widm roztworów kwasów fenolowych wraz z dodatkiem jonów Fe(II) oraz bez ich dodatku.

6. Analiza statystyczna

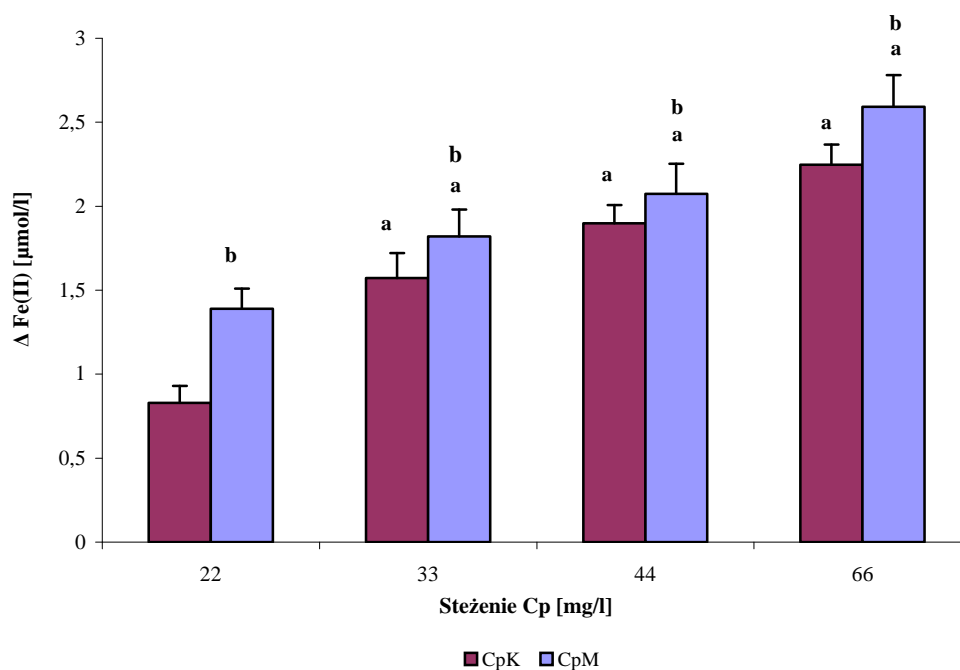
Wyniki przeprowadzonych badań poddano analizie statystycznej w oparciu o program GraphPad InStat. Wartości aktywności ferroksoydazowej C_{pK} i C_{pM} , $\Delta Fe(II)$, stężenia kompleksu Fe(III)-transferyna wyrażano jako średnie i odchylenia standardowe. Wszystkie dane podlegały rozkładowi normalnemu, co sprawdzone zostało testem Kołmogorowa-Smirnova. Ocenę statystyczną wykonano testem wielokrotnych porównań Tukey-Kramera. Odchylenia standardowe nie różniły się między badanymi grupami wyników, co stwierdzono na podstawie testu one-way ANOVA.

Statystyczną istotność przyjęto na poziomie $p \leq 0,05$.

VI. WYNIKI

1. Aktywność ferroksoydazowa Cp wyizolowanej z osocza krwiodawców oraz chorych z PMNT

Wpływ stężenia Cp_K oraz Cp_M na jej aktywność ferroksoydazową, wyrażoną jako zmianę stężenia - $\Delta Fe(II)$ [$\mu mol/l$] w układzie przedstawia rycina 1. Stwierdzono, że aktywność ta uzyskana w obu grupach zależy od stężenia Cp. Wykazano również, iż aktywność ferroksoydazowa Cp_M jest wyższa w porównaniu z aktywnością Cp_K . Przedstawione w tabeli 3 wartości $\Delta Fe(II)$ potwierdzają statystycznie istotny wpływ stężenia Cp na jej zdolność do eliminowania jonów $Fe(II)$ z układu.



Wykres 1. Wpływ stężenia Cp_K i Cp_M na jej aktywność ferroksoydazową.

a-różnica istotna statystycznie $p < 0,001$ w porównaniu ze stężeniem 22 mg/l

b – różnica istotna statystycznie $p < 0,001$ między Cp_K i Cp_M

Stężenie Cp [mg/l]	Cp _K		Cp _M	
	Δ Fe(II) [μmol/l]	% Fe(II)*	Δ Fe(II) [μmol/l]	% Fe(II)*
22,0	0,83	100	1,39	100
33,0	1,08	130	1,79	129
44,0	1,84	222	2,05	147
66,0	2,27	273	2,55	183

Tabela 3. Wpływ stężenia Cp_K i Cp_M na wartości ΔFe(II).

* zmiana stężenia Fe(II) wyeliminowanego z układu wyrażona w % w porównaniu z stężeniem 22 mg/l, przy założeniu, iż Fe(II) dla 22 mg Cp/l wynosi 100%

Następnie podjęto próbę obliczenia maksymalnego stężenia Fe(II), jakie może być wyeliminowane przez Cp_K i Cp_M. Na wykresie 2A (Aneks) przedstawiono krzywe obrazujące zależności odwrotności wartości ΔFe(II) od odwrotności stężeń ceruloplazminy. Równania prostych, na podstawie których obliczono ΔFe(II)_{max} przedstawia tabela 4. Maksymalne stężenie Fe(II), jakie może być wyeliminowane przez Cp_K wynosi 45,05 μmol/l przy zastosowanym w modelu badawczym stężeniu Fe(II), natomiast przez Cp_M 4,43 μmol/l.

Cp _K		Cp _M	
$y = ax + b^*$	$1/b = \Delta Fe(II)_{max}$	$y = ax + b^*$	$1/b = \Delta Fe(II)_{max}$
$y = 26,619x + 0,0222$	45,05	$y = 10,86x + 0,2258$	4,43

Tabela 4. ΔFe(II)_{max} dla układów zawierających Cp_K lub Cp_M.

* Równania prostych $y = ax + b$, czyli $1/\Delta Fe(II) = a(1/Cp) + b$.

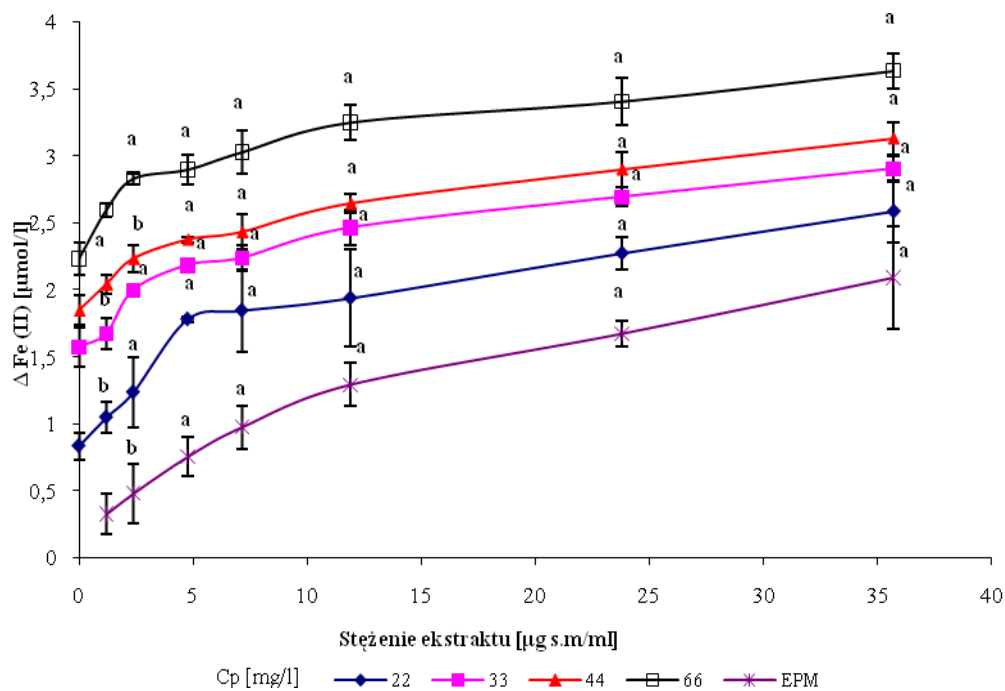
Z założenia: $x=0 \rightarrow y=b$, czyli $1/\Delta Fe(II) = b \rightarrow 1/b = \Delta Fe(II)$ jest maksymalnym stężeniem Fe(II) jakie może zostać wyeliminowane w zastosowanym modelu badawczym

2. Wpływ ekstraktu z pestek maliny na aktywność ferroksoydazową Cp wyizolowanej z osocza krwiodawców oraz chorych z PMNT

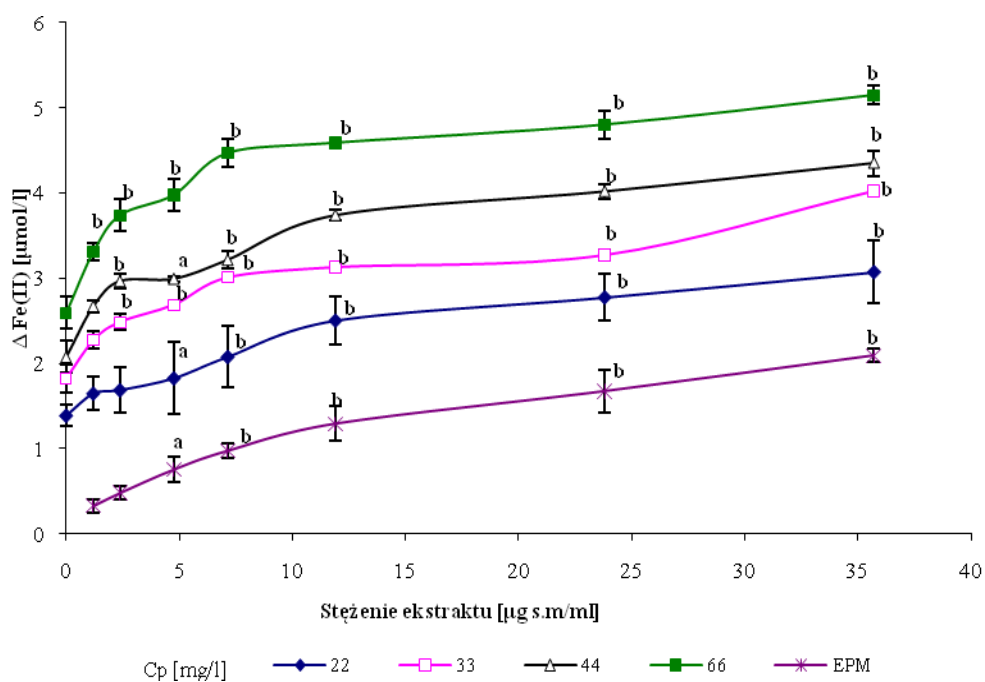
W kolejnym etapie badań oceniano zdolność EPM do eliminowania jonów Fe(II) oraz jego wpływ na aktywność ferroksoydazową C_{pK} oraz C_{pM} (wykres 3 i 4). Z poniższych wykresów wynika, iż EPM wykazuje zdolność do eliminowania Fe(II) w analizowanym zakresie stężeń, a jego dodatek do mieszaniny reakcyjnej zawierającej C_{pK} (wykres 3) lub C_{pM} (wykres 4) powoduje istotne zmniejszenie stężenia Fe(II) (wzrost $\Delta\text{Fe(II)}$ w porównaniu z układem zawierającym wyłącznie Cp). Zaobserwowano, że ze wzrostem stężenia EPM spadek stężenia Fe(II) nie był już tak znaczący, jak w przypadku zastosowania niższych stężeń. Krzywe dotyczące C_{pK} i C_{pM} o stężeniach 44 i 66 mg/l mają podobny przebieg począwszy od stężenia EPM 12,0 $\mu\text{g s.m./ml}$.

Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ zależą również od stężenia C_{pK} oraz C_{pM} w układzie, co obrazują wykresy 3A i 4A (Aneks).

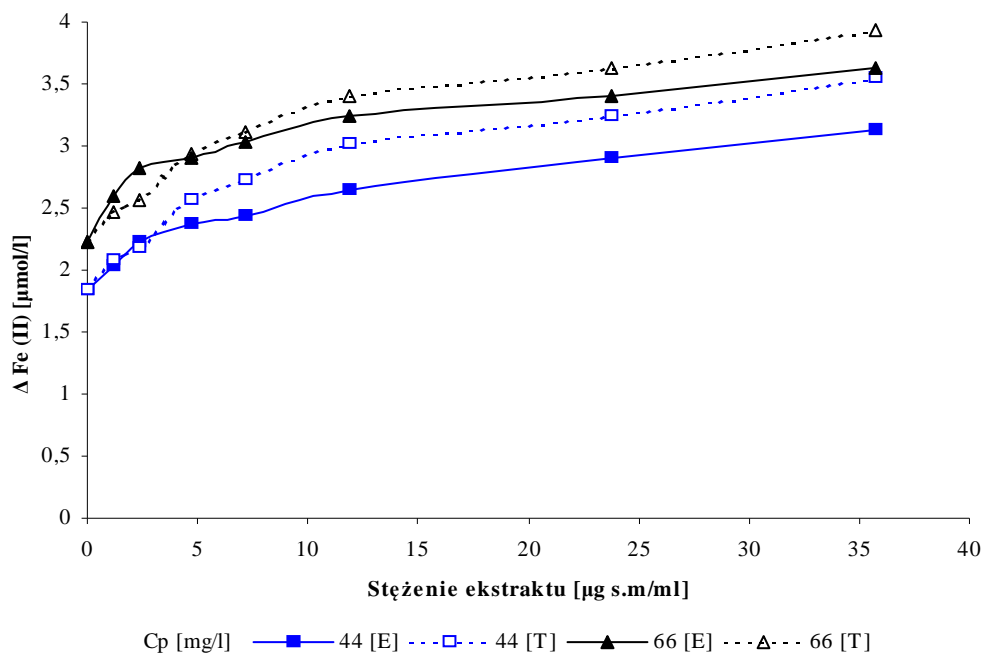
Aby ocenić łączny wpływ EPM i Cp na eliminowanie jonów Fe(II), wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla układów zawierających jednocześnie EPM o zmiennym stężeniu i Cp o stałym stężeniu (eksperymentalne, E) porównano z wartościami $\Delta\text{Fe(II)}$ obliczonymi jako sumy uzyskane w eksperymentach analizujących Cp i EPM oddzielnie (teoretyczne, T). Porównanie przeprowadzono dla dwóch wybranych stężeń C_{pK} i C_{pM} – 44 i 66 mg/l (wykres 5 i 6) i stwierdzono brak istotnych różnic między $\Delta\text{Fe(II)}$ T i $\Delta\text{Fe(II)}$ E.



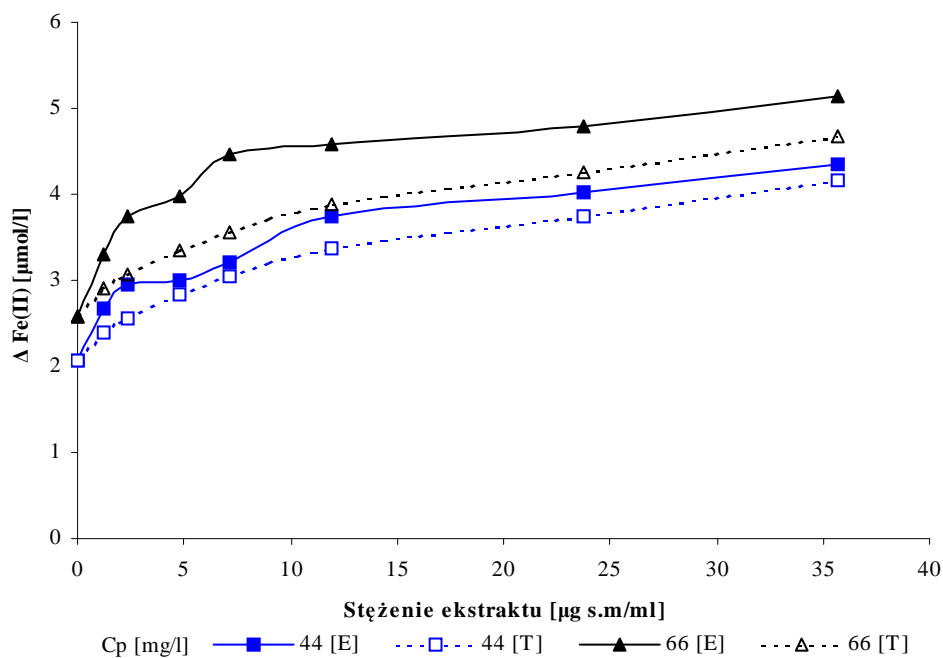
Wykres 3. Wpływ ekstraktu z pestek maliny na aktywność ferroksydazową Cp_K różnica istotna statystycznie w porównaniu z Cp_K lub najniższym stężeniem EPM: **a** - $p < 0,001$ **b** - $p < 0,01$



Wykres 4. Wpływ ekstraktu z pestek maliny na aktywność ferroksydazową Cp_M różnica istotna statystycznie w porównaniu z Cp_M lub najniższym stężeniem EPM: **a** - $p < 0,001$ **b** - $p < 0,01$



Wykres 5. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla prób zawierających Cp_K i EPM (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_K i EPM oddzielnie (teoretyczne, T)



Wykres 6. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla prób zawierających Cp_M i ekstrakt (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_M i EPM oddzielnie (teoretyczne, T)

Następnie obliczono maksymalne stężenia jonów Fe(II), jakie mogą być wyeliminowane przez EPM bez udziału Cp oraz w jej obecności. W tym celu obliczono odwrotności wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ i stężeń ekstraktu, a zależności między nimi przedstawiono na wykresach 7A i 8A (Aneks). Równania prostych, na podstawie których obliczono $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$, przedstawia tabela 5. Maksymalne stężenie Fe(II), jakie może być wyeliminowane przez EPM wynosi 1,87 $\mu\text{mol/l}$ przy zastosowanym początkowym stężeniu Fe(II) (71,4 μM), przy czym ze wzrostem stężenia C_{pK} i C_{pM} zaobserwowano wzrost $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$.

Cp [mg/l]	Cp _K		Cp _M	
	y = ax + b*	1/b = $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$	y = ax + b*	1/b = $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$
EPM	y = 3,1909x + 0,5340	1,87	y = 3,1909x + 0,5340	1,87
22,0	y = 0,6859x + 0,4294	2,33	y = 0,3237x + 0,3919	2,55
33,0	y = 0,2836x + 0,3758	2,66	y = 0,1979x + 0,2963	3,38
44,0	y = 0,1818x + 0,3564	2,80	y = 0,1567x + 0,2613	3,83
66,0	y = 0,1173x + 0,2977	3,36	y = 0,1245x + 0,2067	4,84

Tabela 5. $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$ dla układów zawierających EPM i Cp_K lub Cp_M.

* Równania prostych y = ax + b, czyli $1/\Delta\text{Fe(II)} = a(1/\text{EPM}) + b$.

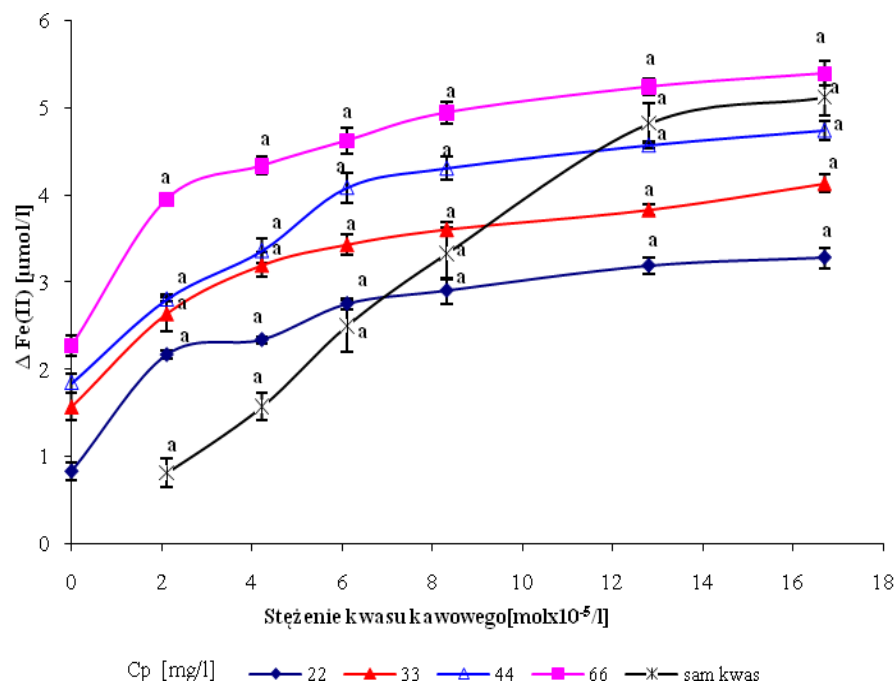
Z założenia: x=0 \rightarrow y=b, czyli $1/\Delta\text{Fe(II)} = b \rightarrow 1/b = \Delta\text{Fe(II)}$ jest maksymalnym stężeniem Fe(II) jakie może zostać wyeliminowane w zastosowanym modelu badawczym

3. Wpływ kwasu kawowego na aktywność ferroksoydazową Cp wyizolowanej z osocza krwiodawców i chorych z PMNT

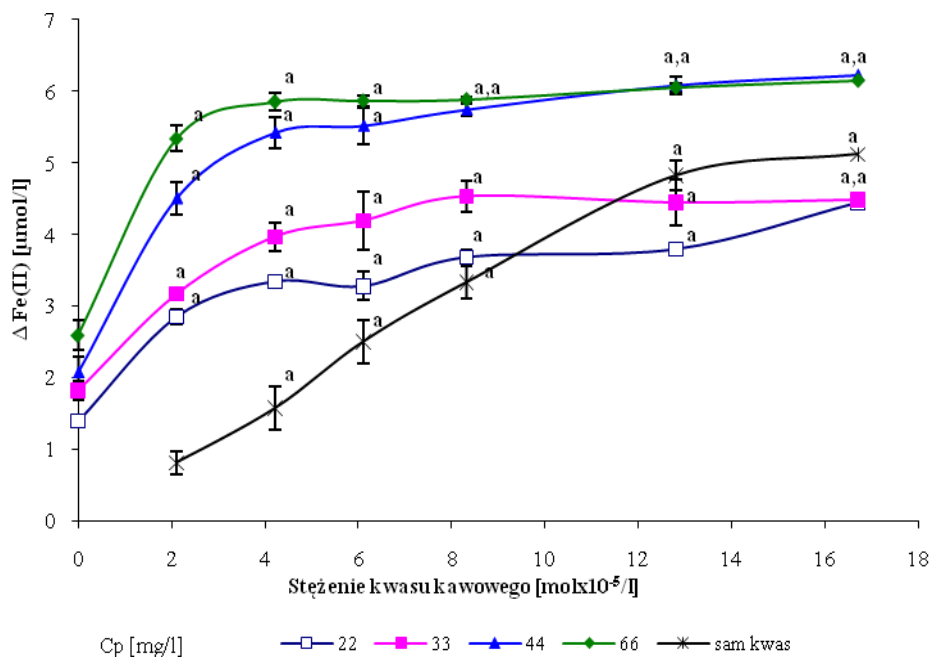
W kolejnym etapie badań oceniano zdolność kwasu kawowego do eliminowania jonów Fe(II) oraz jego wpływ na aktywność ferroksoydazową C_{pK} oraz C_{pM} (wykres 9 i 10). Z poniższych wykresów wynika, iż kwas kawowy w analizowanym zakresie stężeń wykazuje zdolność do eliminowania Fe(II), a jego dodatek do mieszaniny reakcyjnej zawierającej C_{pK} (wykres 9) lub C_{pM} (wykres 10), powoduje istotne zmniejszenie stężenia Fe(II). Zaobserwowano, że ze wzrostem stężenia kwasu kawowego spadek stężenia Fe(II) ten nie był już tak znaczący, jak w przypadku zastosowania niższych stężeń.

Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ zależą również od stężenia C_{pK} oraz C_{pM} w układzie, co obrazują wykresy 9A i 10A (Aneks).

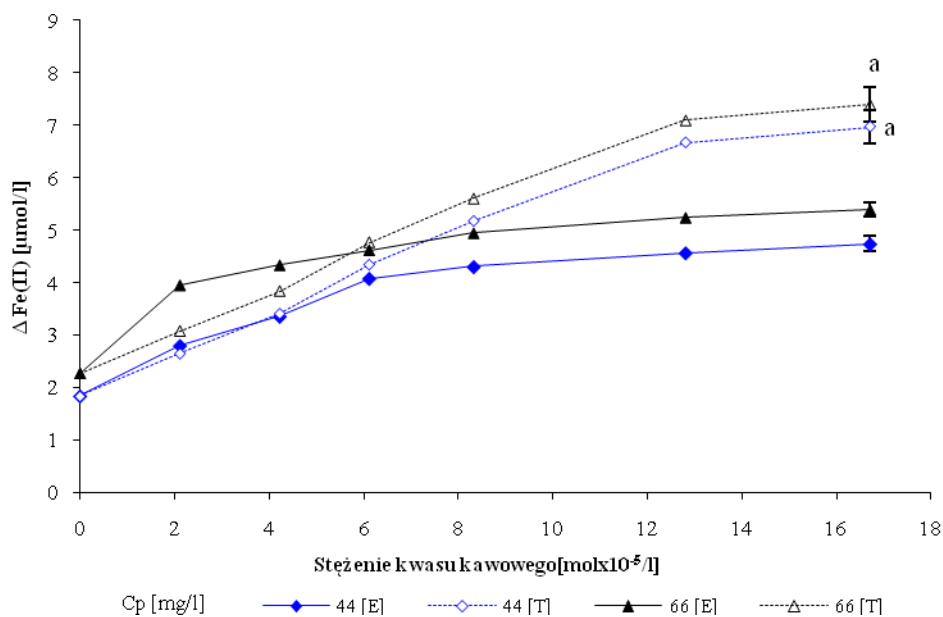
Następnie porównano wartości $\Delta\text{Fe(II) E}$ i $\Delta\text{Fe(II) T}$ uzyskanych dla 44 i 66 mg/l C_{pK} i C_{pM} w obecności kwasu kawowego (wykres 11 i 12) i stwierdzono, że dla najwyższego stężenia kwasu $\Delta\text{Fe(II) T}$ są istotnie wyższe od $\Delta\text{Fe(II) E}$.



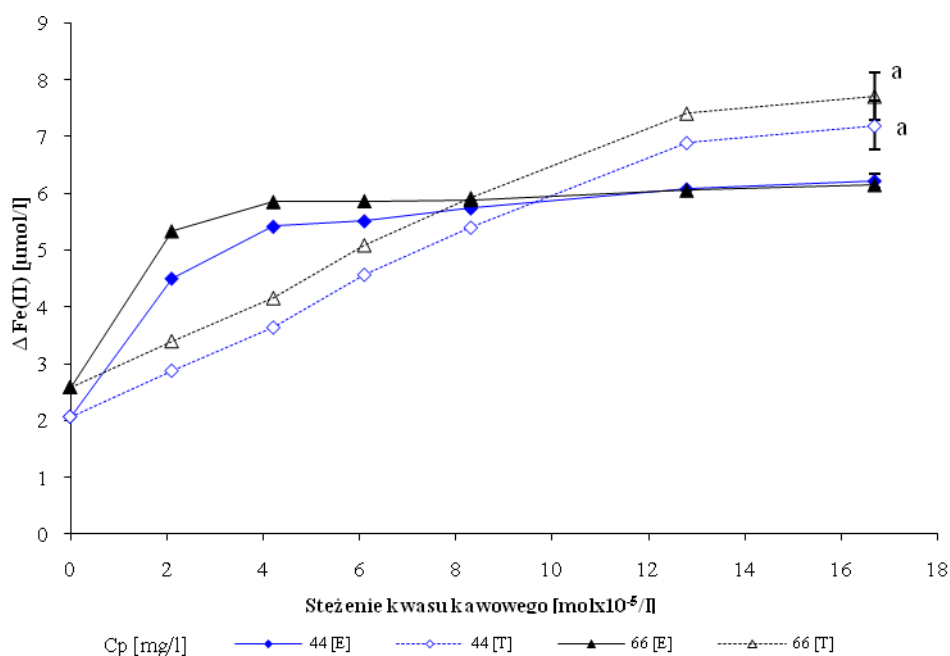
Wykres 9. Wpływ kwasu kawowego na aktywność ferroksydazową Cp_K .
różnica istotna statystycznie w porównaniu z Cp_K lub najniższym stężeniem kwasu kawowego
a - $p < 0,001$



Wykres 10. Wpływ kwasu kawowego na aktywność ferroksydazową Cp_M .
różnica istotna statystycznie w porównaniu z Cp_K lub najniższym stężeniem kwasu kawowego
a - $p < 0,001$



Wykres 11. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla próbek zawierających Cp_K i kwas kawowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_K i kwas oddzielnie (teoretyczne, T)
różnica istotna statystycznie w porównaniu $\Delta\text{Fe(II)}$ E dla najwyższego stężenia kwasu kawowego
a - $p \leq 0,05$



Wykres 12. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla próbek zawierających Cp_M i kwas kawowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_M i kwas oddzielnie (teoretyczne, T)
różnica istotna statystycznie w porównaniu $\Delta\text{Fe(II)}$ E dla najwyższego stężenia kwasu kawowego
a - $p \leq 0,05$

Następnie obliczono maksymalne stężenia jonów Fe(II), jakie mogą być wyeliminowane przez kwas kawowy bez udziału Cp oraz w jej obecności. W tym celu obliczono odwrotności wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ i stężeń kwasu kawowego, a zależności między nimi przedstawiono na wykresach 13A i 14A (Aneks). Równania prostych, na podstawie których obliczono $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$ przedstawia tabela 6. Maksymalne stężenie Fe(II), jakie może być wyeliminowane przez kwas kawowy wynosi 64,10 $\mu\text{mol/l}$ przy zastosowanym początkowym stężeniu Fe(II) (71,4 μM), przy czym dodatek Cp istotnie zmniejszył udział kwasu kawowego w eliminowaniu wolnych jonów Fe(II).

Cp [mg/l]	Cp _K		Cp _M	
	$y = ax + b^*$	$1/b = \Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$	$y = ax + b^*$	$1/b = \Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$
kwas kawowy	$y = 2,5228x + 0,0156$	64,10	$y = 2,5228x + 0,0156$	64,10
22,0	$y = 0,6843x + 0,2610$	3,83	$y = 0,3806x + 0,2230$	4,50
33,0	$y = 0,3751x + 0,2274$	4,40	$y = 0,1703x + 0,2096$	4,78
44,0	$y = 0,4704x + 0,1780$	5,62	$y = 0,1383x + 0,1548$	6,46
66,0	$y = 0,2600x + 0,1709$	5,85	$y = 0,0460x + 0,1611$	6,20

Tabela 6. $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$ dla układów zawierających kwas kawowy i Cp_K lub Cp_M.

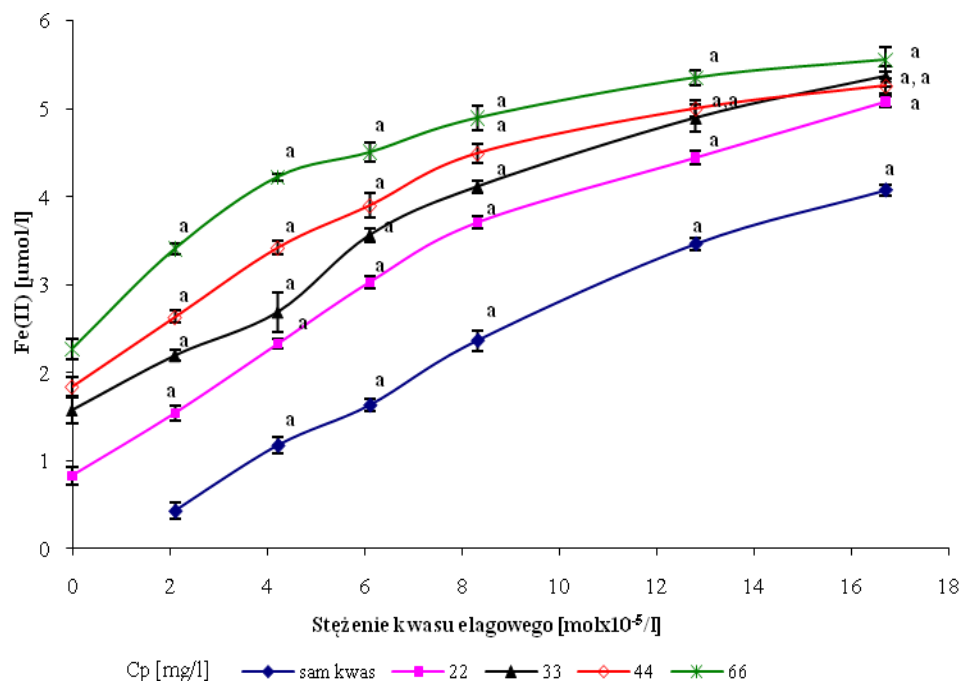
* Równania prostych $y = ax + b$, czyli $1/\Delta\text{Fe(II)} = a(1/\text{RSE}) + b$.

Z założenia: $x=0 \rightarrow y=b$, czyli $1/\Delta\text{Fe(II)} = b \rightarrow 1/b = \Delta\text{Fe(II)}$ jest maksymalnym stężeniem Fe(II) jakie może zostać wyeliminowane w zastosowanym modelu badawczym

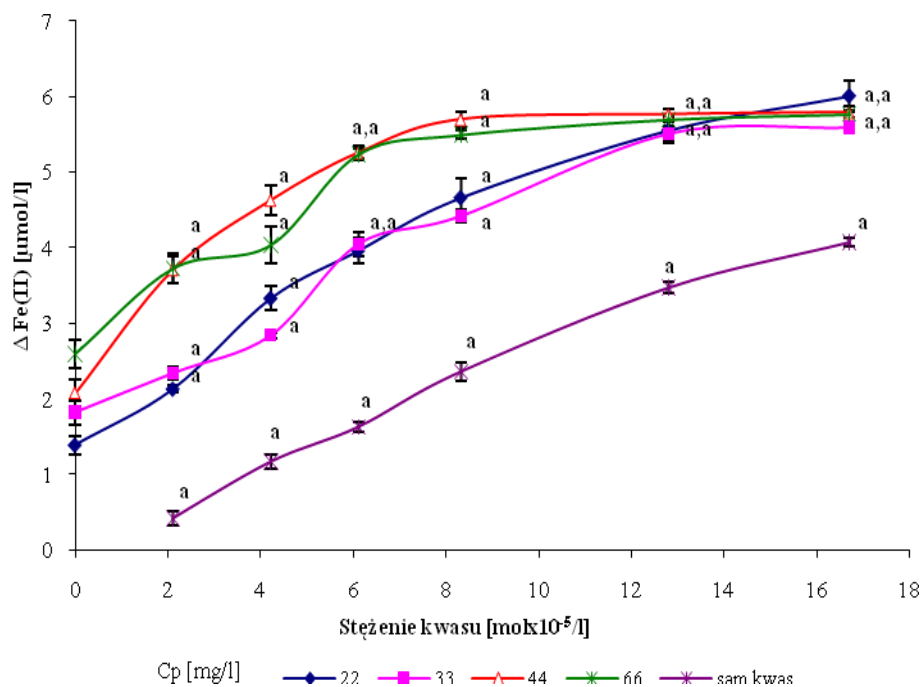
4. Wpływ kwasu elagowego na aktywność ferroksoydazową Cp wyizolowanej z osocza krwiodawców i chorych z PMNT

W kolejnym etapie badań oceniano zdolność kwasu elagowego do eliminowania jonów Fe(II) oraz jego wpływ na aktywność ferroksoydazową Cp_K oraz Cp_M (wykres 15 i 16). Z poniższych wykresów wynika, iż kwas elagowy wykazuje zdolność do eliminowania Fe(II) w analizowanym zakresie stężeń, a jego dodatek do mieszaniny reakcyjnej zawierającej Cp_K (wykres 15) lub Cp_M (wykres 16), powoduje istotne zmniejszenie stężenia Fe(II). Zaobserwowano, że ze wzrostem stężenia kwasu elagowego spadek stężenia Fe(II) ten nie był już tak znaczący, jak w przypadku zastosowania niższych stężeń. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ zależą również od stężenia Cp_K oraz Cp_M w układzie, co obrazują wykresy 15A i 16A (Aneks).

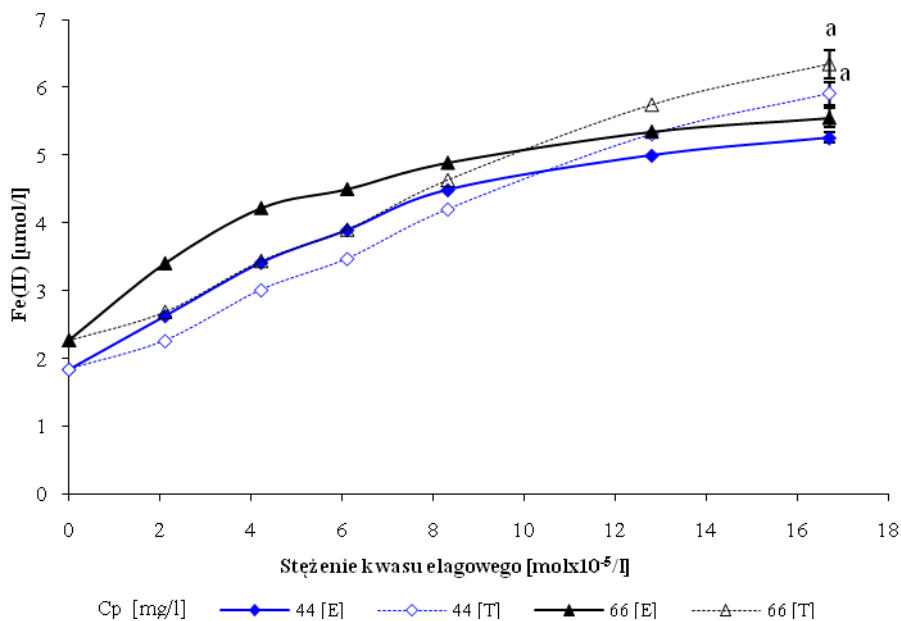
Następnie porównano wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ E i $\Delta\text{Fe(II)}$ T uzyskanych dla 44 i 66 mg/l Cp_K i Cp_M w obecności kwasu elagowego (wykres 17 i 18). Stwierdzono, iż wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ T są istotnie wyższe od $\Delta\text{Fe(II)}$ E dla najwyższego stężenia kwasu elagowego.



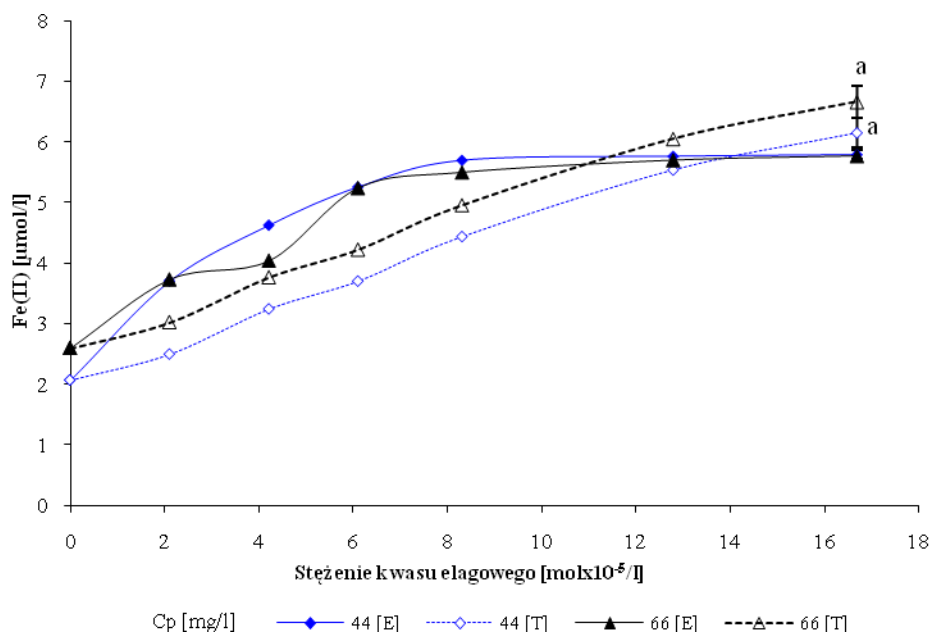
Wykres 15. Wpływ kwasu elagowego na aktywność ferroksydazową C_{pK} . różnica istotna statystycznie w porównaniu z C_{pK} lub najniższym stężeniem kwasu elagowego
a - $p < 0,001$



Wykres 16. Wpływ kwasu elagowego na aktywność ferroksydazową C_{pM} . różnica istotna statystycznie w porównaniu z C_{pK} lub najniższym stężeniem kwasu elagowego
a - $p < 0,001$



Wykres 17. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla próbek zawierających Cp_K i kwas elagowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_K i kwas oddzielnie (teoretyczne, T)
różnica istotna statystycznie w porównaniu $\Delta\text{Fe(II)}$ E dla najwyższego stężenia kwasu elagowego
a - $p \leq 0,05$



Wykres 18. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla próbek zawierających Cp_M i kwas elagowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_M i kwas oddzielnie (teoretyczne, T)
różnica istotna statystycznie w porównaniu $\Delta\text{Fe(II)}$ E dla najwyższego stężenia kwasu elagowego
a - $p \leq 0,05$

Następnie obliczono maksymalne stężenia jonów Fe(II), jakie mogą być wyeliminowane przez kwas elagowy bez udziału Cp oraz w jej obecności. W tym celu obliczono odwrotności wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ i stężeń kwasu elagowego, a zależności między nimi przedstawiono na wykresach 19A i 20A (Aneks). Równania prostych, na podstawie których obliczono $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$ przedstawia tabela 7. Maksymalne stężenie Fe(II), jakie może być wyeliminowane przez kwas elagowy wynosi 48,80 $\mu\text{mol/l}$ przy zastosowanym początkowym stężeniu Fe(II) (71,4 μM), przy czym dodatek Cp istotnie zmniejszył udział kwasu elagowego w eliminowaniu wolnych jonów Fe(II).

Cp [mg/l]	Cp _K		Cp _M	
	$y = ax + b^*$	$1/b = \Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$	$y = ax + b^*$	$1/b = \Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$
kwas elagowy	$y = 3,5265x + 0,0205$	48,80	$y = 5,1942x - 0,1795$	48,80
22,0	$y = 1,3032x + 0,1187$	8,42	$y = 0,7479x + 0,1279$	7,82
33,0	$y = 1,004x + 0,1466$	6,82	$y = 0,9657x + 0,1107$	9,03
44,0	$y = 0,5904x + 0,1546$	6,47	$y = 0,2876x + 0,1430$	6,99
66,0	$y = 0,3287x + 0,1628$	6,14	$y = 0,3613x + 0,1447$	6,91

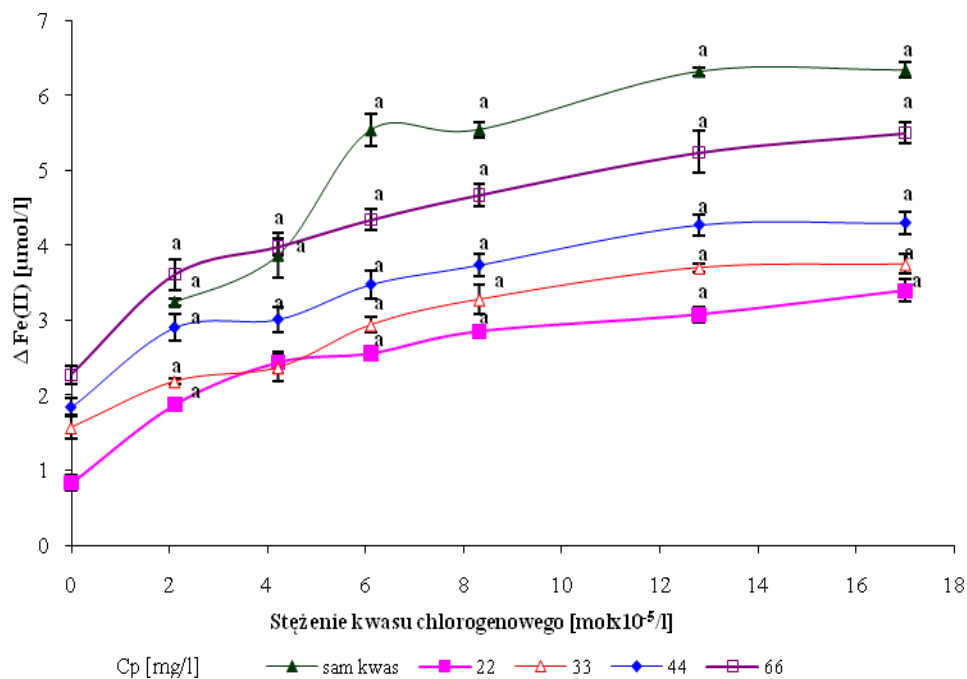
Tabela 7. $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$ dla układów zawierających kwas elagowy i Cp_K lub Cp_M.

* Równania prostych $y = ax + b$, czyli $1/\Delta\text{Fe(II)} = a(1/\text{kwas elagowy}) + b$, gdy $1/\text{kwas elagowy} \rightarrow 0$
Z założenia: $x=0 \rightarrow y=b$, czyli $1/\Delta\text{Fe(II)} = b \rightarrow 1/b = \Delta\text{Fe(II)}$ jest maksymalnym stężeniem Fe(II) jakie może zostać wyeliminowane w zastosowanym modelu badawczym

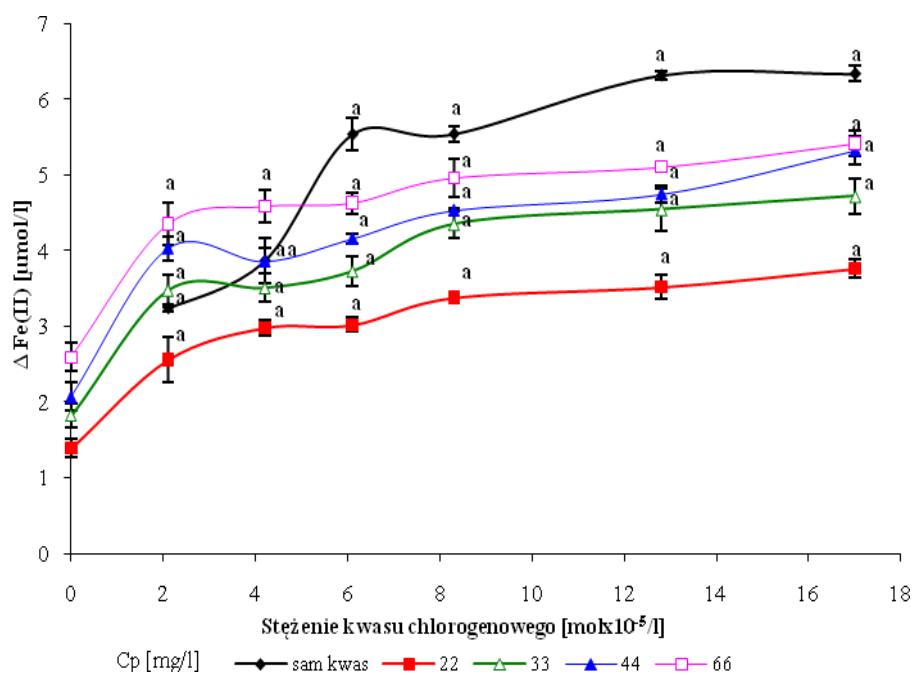
5. Wpływ kwasu chlorogenowego na aktywność ferroksoydazową Cp wyizolowanej z osocza krwiodawców i chorych z PMNT

Następnie oceniono zdolność kwasu chlorogenowego do eliminowania jonów Fe(II) oraz jego wpływ na aktywność ferroksoydazową C_{pK} oraz C_{pM} (wykres 21 i 22). Kwas chlorogenowy wykazał zdolność do eliminowania Fe(II) w zakresie analizowanych stężeń, a jego dodatek do układów zawierających stałe stężenie C_{pK} i C_{pM} wpłynął na wzrost $\Delta\text{Fe(II)}$. Należy jednak zwrócić uwagę na znacznie wyższe wartości $\Delta\text{Fe(II)}$, jakie uzyskano wyłącznie dla kwasu chlorogenowego w porównaniu z wartościami jakie uzyskano dla układów z C_{pK} i C_{pM} . Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ zależą również od stężenia C_{pK} oraz C_{pM} w układzie, co obrazują wykresy 21A i 22A (Aneks).

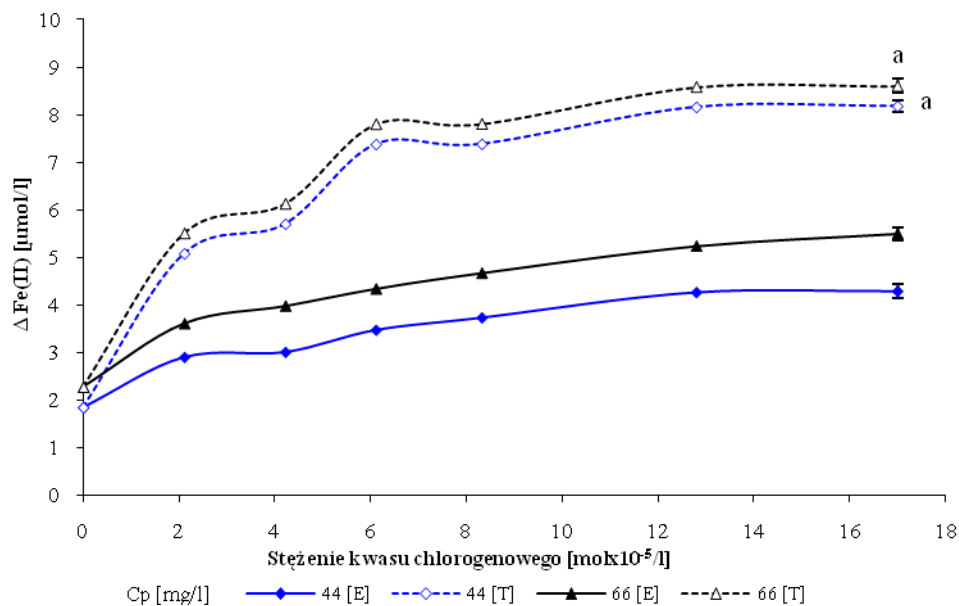
W kolejnym etapie porównano wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ E i T uzyskanych dla 44 i 66 mg/l C_{pK} oraz C_{pM} w obecności kwasu chlorogenowego (wykres 23 i 24). Stwierdzono, iż wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ T są istotnie wyższe od $\Delta\text{Fe(II)}$ E dla najwyższego stężenia kwasu chlorogenowego.



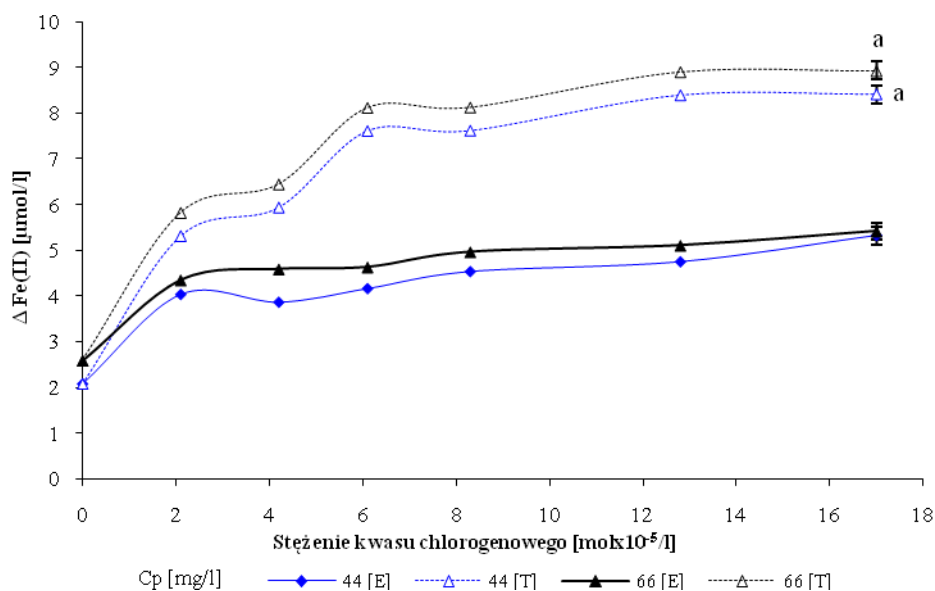
Wykres 21. Wpływ kwasu chlorogenowego na aktywność ferroksozydazową C_{pK} . różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym wyłącznie C_{pK} lub kwasem a - $p < 0,001$



Wykres 22. Wpływ kwasu chlorogenowego na aktywność ferroksozydazową C_{pM} . różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym wyłącznie C_{pK} lub kwasem a - $p < 0,001$



Wykres 23. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla próbek zawierających Cp_K i kwas chlorogenowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_K i kwas oddzielnie (teoretyczne, T)
różnica istotna statystycznie w porównaniu $\Delta\text{Fe(II)}$ E dla najwyższego stężenia kwasu chlorogenowego
a - $p \leq 0,05$



Wykres 24. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla próbek Cp_M i kwas chlorogenowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_M i kwas oddzielnie (teoretyczne, T)
różnica istotna statystycznie w porównaniu $\Delta\text{Fe(II)}$ E dla najwyższego stężenia kwasu chlorogenowego
a - $p \leq 0,05$

Następnie obliczono maksymalnego stężenia jonów Fe(II) jakie mogą być wyeliminowane przez kwas chlorogenowy w układzie bez udziału C_{pK} lub C_{pM} oraz w jej obecności. W tym celu obliczono odwrotności wartości $\Delta Fe(II)$ i stężeń kwasu chlorogenowego, a zależności między nimi przedstawiono na wykresach 25A i 26A (Aneks). Równania prostych, na podstawie których obliczono $\Delta Fe(II)_{max}$ przedstawia tabela 8. Maksymalne stężenie Fe(II) jakie może być wyeliminowane z układu wyłącznie przez kwas chlorogenowy wynosi 7,44 $\mu\text{mol/l}$ przy zastosowanym początkowym stężeniu Fe(II). Dodatek Cp istotnie zmniejszał udział kwasu chlorogenowego w eliminowaniu wolnych jonów Fe(II).

Cp [mg/l]	Cp _K		Cp _M	
	$y = ax + b^*$	$1/b = \Delta Fe(II)_{max}$	$y = ax + b^*$	$1/b = \Delta Fe(II)_{max}$
kwas chlorogenowy	$y = 0,3886x + 0,1344$	7,44	$y = 0,3886x + 0,1344$	7,44
22,0	$y = 0,5434x + 0,2821$	3,54	$y = 0,28x + 0,2641$	3,78
33,0	$y = 0,4835x + 0,2525$	3,96	$y = 0,182x + 0,2161$	4,63
44,0	$y = 0,2772x + 0,231$	4,33	$y = 0,1224x + 0,2047$	4,88
66,0	$y = 0,2213x + 0,1826$	5,47	$y = 0,0955x + 0,1896$	5,27

Tabela 8. $\Delta Fe(II)_{max}$ dla układów zawierających kwas chlorogenowy i C_{pK} lub C_{pM}

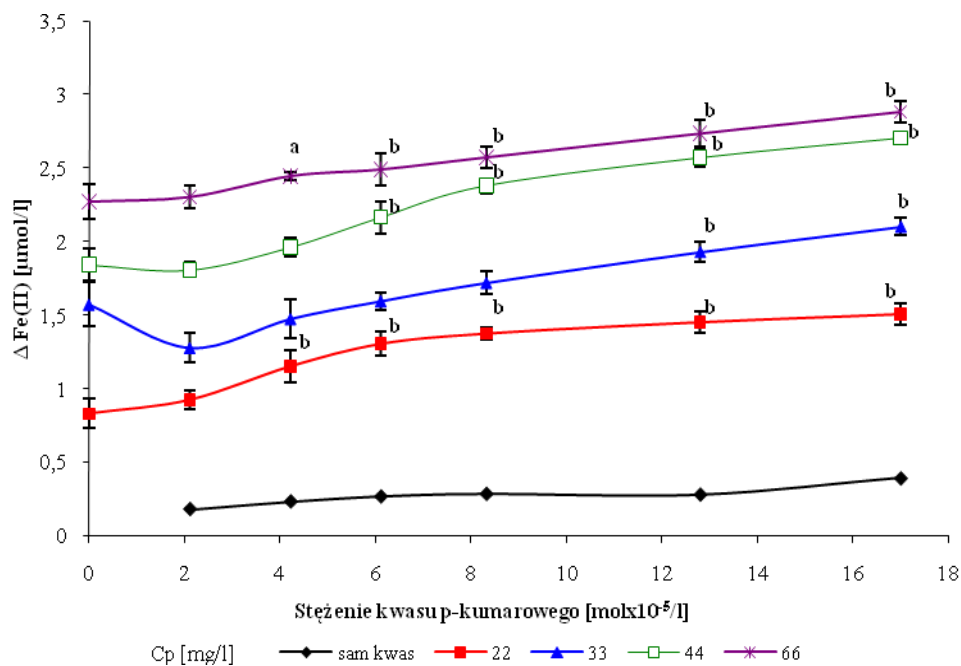
* Równania prostych $y = ax + b$, czyli $1/\Delta Fe(II) = a(1/\text{kwas chlorogenowy}) + b$, gdy $1/\text{kwas chlorogenowy} \rightarrow 0$

Z założenia: $x=0 \rightarrow y=b$, czyli $1/\Delta Fe(II) = b \rightarrow 1/b = \Delta Fe(II)$ jest maksymalnym stężeniem Fe(II) jakie może zostać wyeliminowane w zastosowanym modelu badawczym

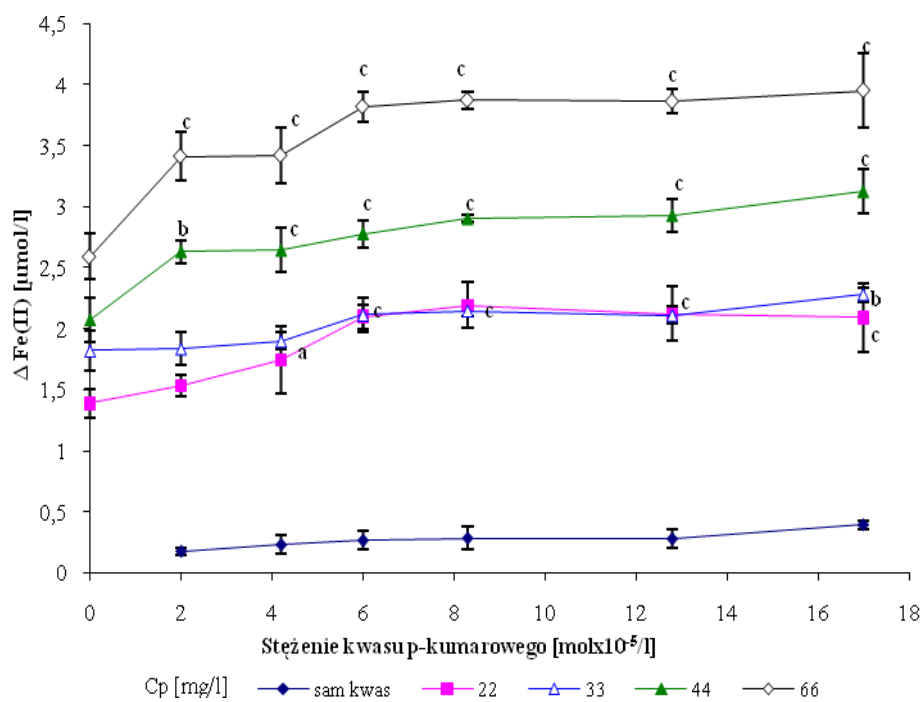
6. Wpływ kwasu p-kumarowego na aktywność ferroksoydazową Cp wyizolowanej z osocza krwiodawców i chorych z PMNT

W kolejnym etapie badań oceniano zdolność kwasu p-kumarowego do eliminowania jonów Fe(II) oraz jego wpływ na aktywność ferroksoydazową Cp, oraz Cp_M (wykres 27 i 28). Kwas p-kumarowy wykazał niewielką zdolność do eliminowania Fe(II) w analizowanym zakresie stężeń. Dodatek kwasu w zakresie stężeń 6,0 – 17,0 molx10⁻⁵/l do 22 i 44 mg/l Cp_K (wykres 27) oraz spowodował istotny wzrost ΔFe(II) w porównaniu z układem zawierającym wyłącznie Cp_K. Podobną zależność zaobserwowano dla 44 i 66 mg/l Cp_M w całym analizowanym zakresie stężeń kwasu p-kumarowego (wykres 28). Wartości ΔFe(II) zależą również od stężenia Cp_K oraz Cp_M w układzie, co obrazują wykresy 27A i 28A (Aneks).

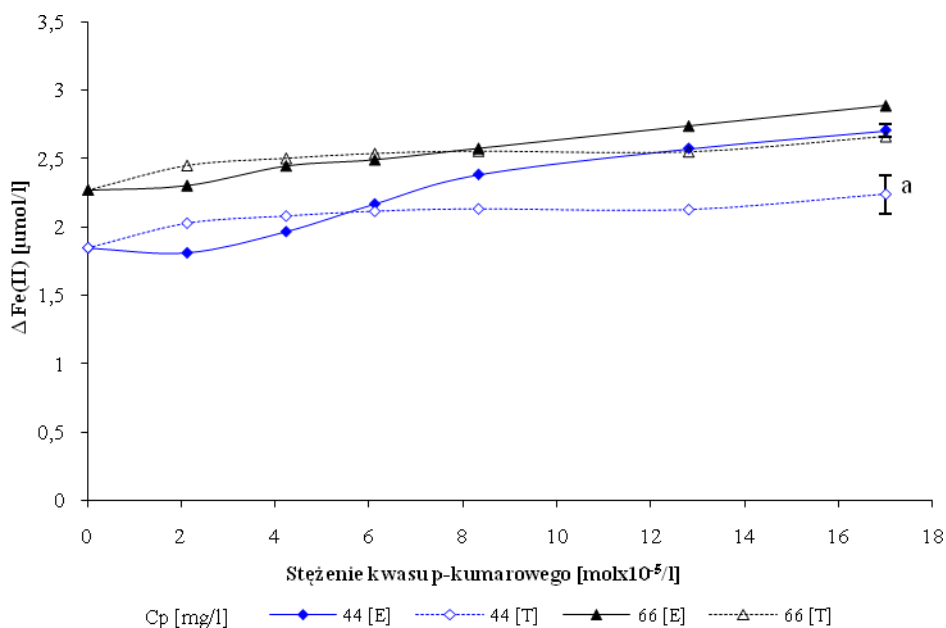
Następnie porównano wartości ΔFe(II) E i T uzyskanych dla 44 i 66 mg/l Cp_K lub Cp_M w obecności kwasu p-kumarowego (wykres 29 i 30). Stwierdzono, iż wartości ΔFe(II) T są istotnie niższe od wartości ΔFe(II) E dla najwyższego stężenia kwasu oraz 44 mg/l Cp_K i 66 mg/l Cp_M.



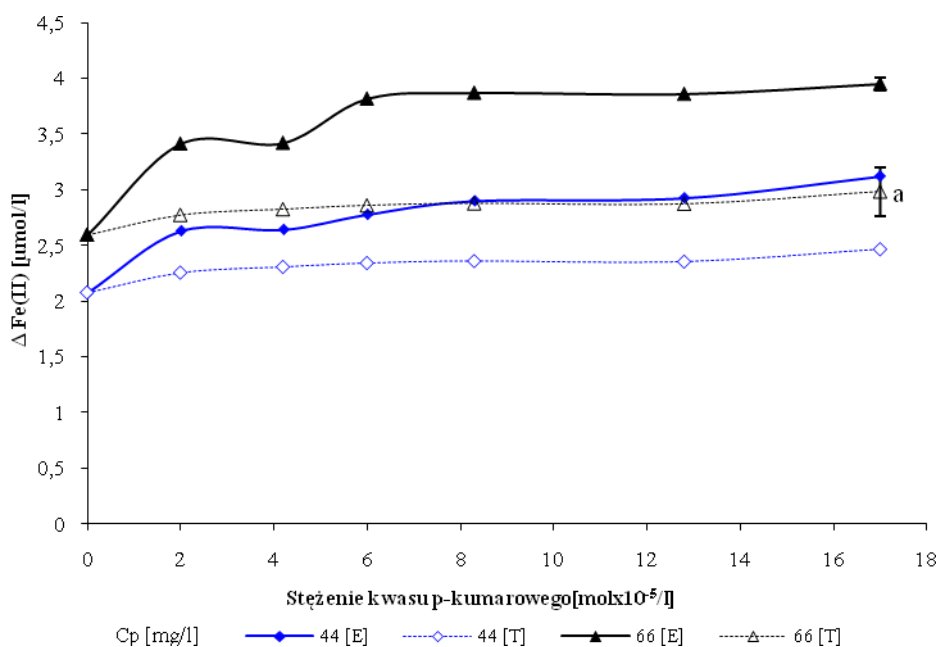
Wykres 27. Wpływ kwasu p-kumarowego na aktywność ferroksydazową C_{pK} . różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym wyłącznie C_{pK}
a - $p < 0,05$ **b** - $p < 0,001$



Wykres 28. Wpływ kwasu p-kumarowego na aktywność ferroksydazową C_{pM} . różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym wyłącznie C_{pM} .
b - $p < 0,01$ **c** - $p < 0,001$ **a** - $p < 0,05$



Wykres 29. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla prób zawierających Cp_K i kwas p-kumarowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp i kwas oddzielnie (teoretyczne, T)
różnica istotna statystycznie w porównaniu $\Delta\text{Fe(II)}$ E dla najwyższego stężenia kwasu p-kumarowego
a - $p \leq 0,05$



Wykres 30. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla prób zawierających Cp_M i kwas p-kumarowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_M i kwas oddzielnie (teoretyczne, T)
różnica istotna statystycznie w porównaniu $\Delta\text{Fe(II)}$ E dla najwyższego stężenia kwasu p-kumarowego
a - $p \leq 0,05$

Następnie obliczono maksymalne stężenia jonów Fe(II), jakie mogą być wyeliminowane przez kwas p-kumarowy w układzie bez udziału C_{pK} lub C_{pM} oraz w jej obecności. W tym celu obliczono odwrotności wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ i stężeń kwasu p-kumarowego, a zależności między nimi przedstawiono na wykresach 31A i 32A (Aneks). Równania prostych, na podstawie których obliczono $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$ przedstawia tabela 9. Maksymalne stężenie Fe(II) jakie może być wyeliminowane przez kwas p-kumarowy wynosi 0,40 $\mu\text{mol/l}$ przy zastosowanym początkowym stężeniu Fe(II) 71,4 μM . Dodatek C_p istotnie wspomagał udział kwasu p-kumarowego w eliminowaniu wolnych jonów Fe(II).

C_p [mg/l]	C_{pK}		C_{pM}	
	$y = ax + b^*$	$1/b = \Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$	$y = ax + b^*$	$1/b = \Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$
kwas p-kumarowy	$y = 6,2206x + 2,6961$	0,40	$y = 6,2206x + 2,6961$	0,40
22,0	$y = 1,0164x + 0,6975$	1,64	$y = 0,4782x + 0,4276$	2,34
33,0	$y = 0,6947x + 0,4796$	2,08	$y = 0,2344x + 0,4427$	2,26
44,0	$y = 0,4337x + 0,3688$	2,71	$y = 0,1261x + 0,3305$	3,02
66,0	$y = 0,1833x + 0,3564$	2,80	$y = 0,1021x + 0,2504$	3,99

Tabela 9. $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$ dla układów zawierających kwas p-kumarowy i C_{pK} lub C_{pM} .

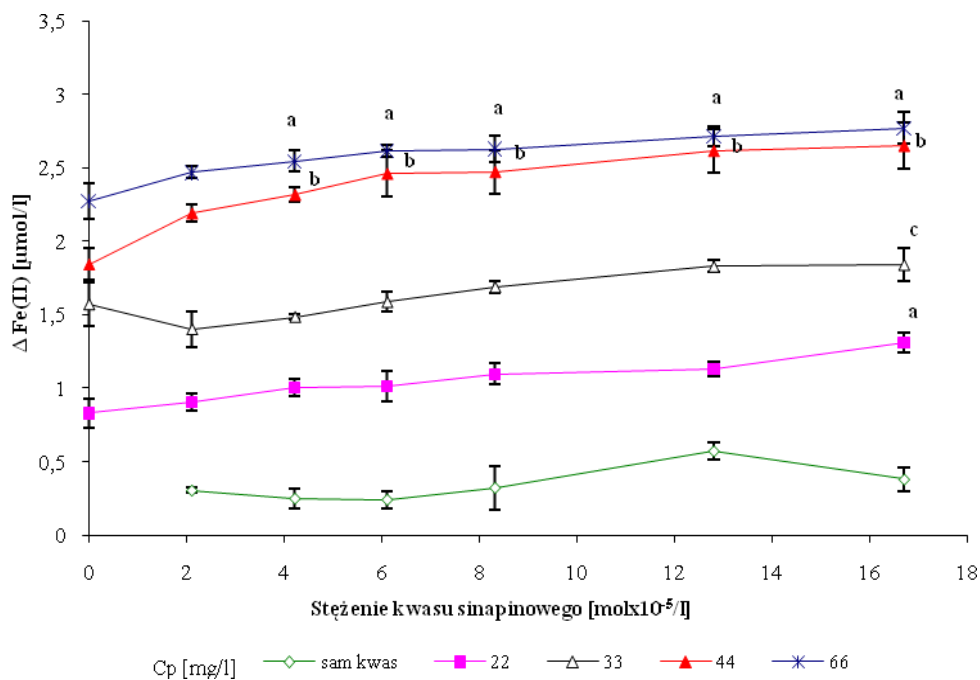
* Równania prostych $y = ax + b$, czyli $1/\Delta\text{Fe(II)} = a(1/\text{kwas p-kumarowy}) + b$, gdy $1/\text{kwas p-kumarowy} \rightarrow 0$

Z założenia: $x=0 \rightarrow y=b$, czyli $1/\Delta\text{Fe(II)} = b \rightarrow 1/b = \Delta\text{Fe(II)}$ jest maksymalnym stężeniem Fe(II) jakie może zostać wyeliminowane w zastosowanym modelu badawczym

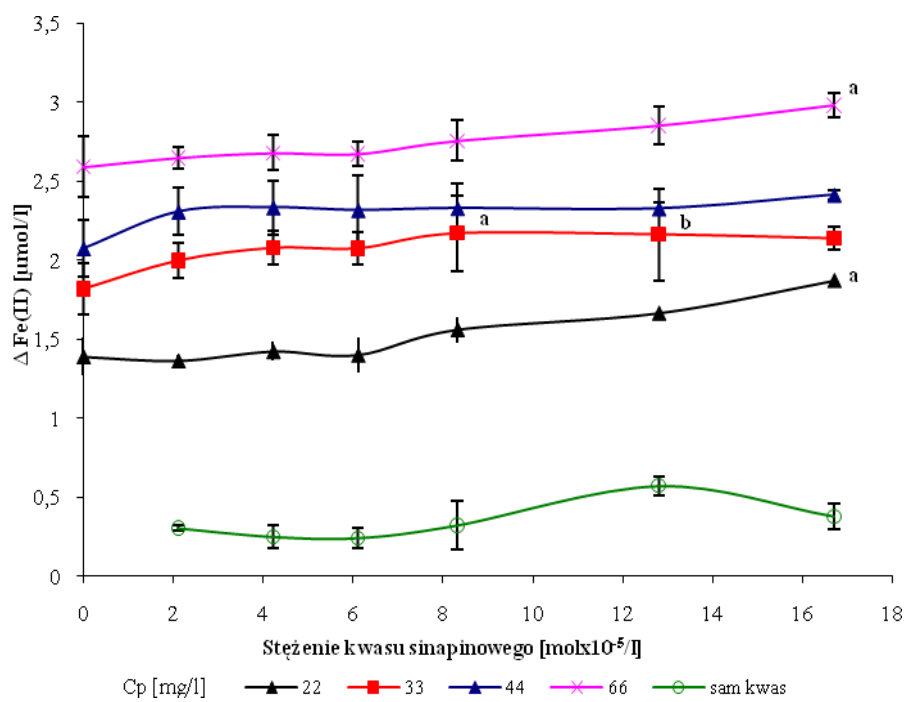
7. Wpływ kwasu sinapinowego na aktywność ferroksydazową Cp wyizolowanej z osocza krwiodawców i chorych z PMNT

W następnym etapie badań oceniano zdolność kwasu sinapinowego do eliminowania jonów Fe(II) oraz jego wpływ na aktywność ferroksydazową Cp_K oraz Cp_M (wykres 33 i 34). Z poniższych wykresów wynika, iż kwas sinapinowy wykazuje bardzo słabą zdolność do eliminowania Fe(II) w analizowanym zakresie stężeń. Dodatek kwasu sinapinowego w stężeniu $17,0 \text{ mol} \times 10^{-5} / \text{l}$ do mieszaniny reakcyjnej zawierającej 44 i 66 mg/l Cp_K (wykres 33) oraz 33 i 66 mg/l Cp_M (wykres 34) wpłynął na istotny wzrost $\Delta\text{Fe(II)}$. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ zależą również od stężenia Cp_K oraz Cp_M w układzie, co obrazują wykresy 33A i 34A (Aneks).

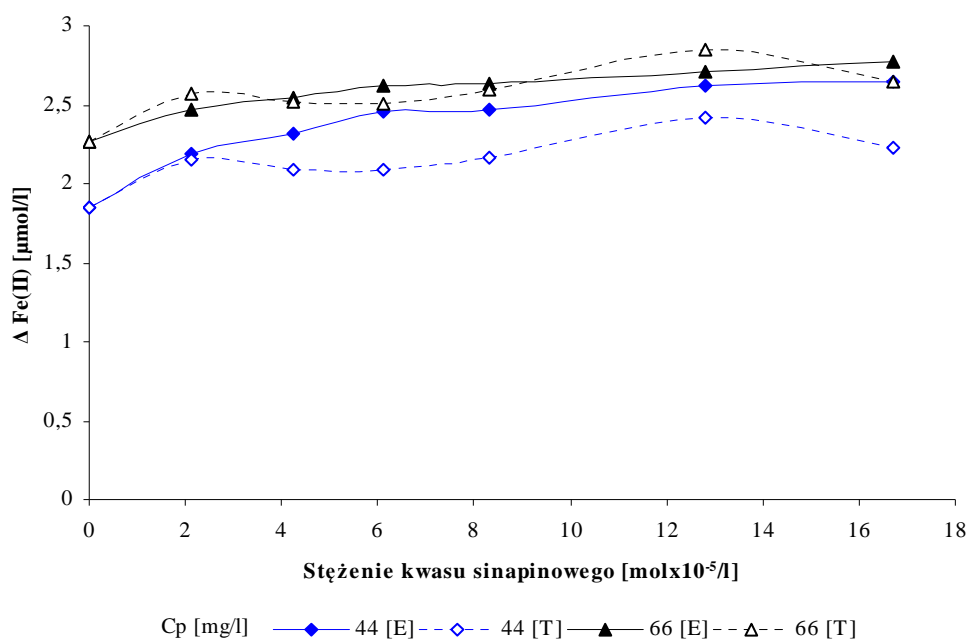
Następnie porównano wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ E i T uzyskanych dla 44 i 66 mg/l Cp_K lub Cp_M w obecności kwasu sinapinowego (wykres 35 i 36). Stwierdzono, iż wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ E nie różnią się od wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ T.



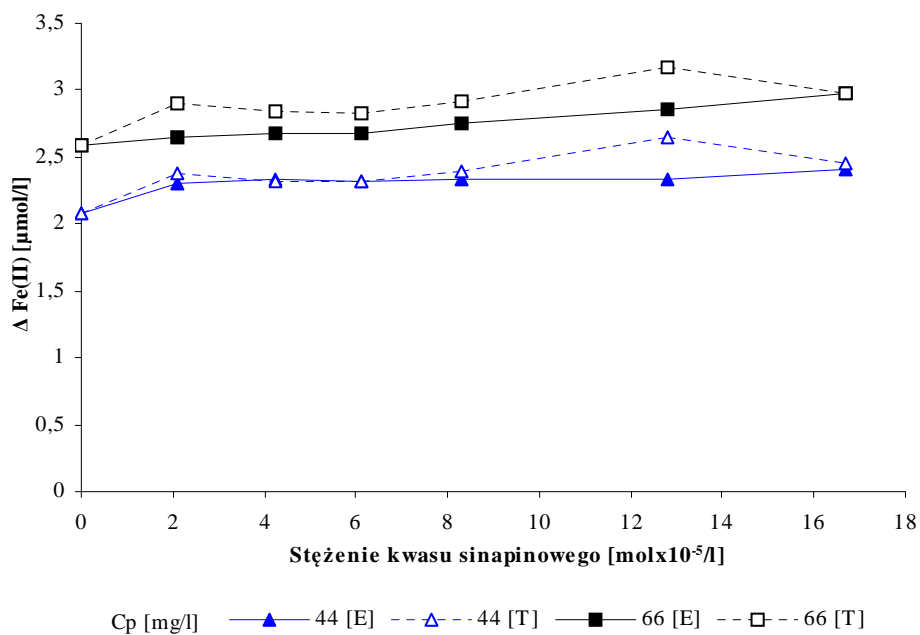
Wykres 33. Wpływ kwasu sinapinowego na aktywność ferroksydazową Cp_K .
Różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym wyłącznie Cp_K :
c - $p < 0,05$ b - $p < 0,01$ a - $p < 0,001$



Wykres 34. Wpływ kwasu sinapinowego na aktywność ferroksydazową Cp_M .
różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym wyłącznie Cp_M :
a - $p < 0,01$ b - $p < 0,05$



Wykres 35. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla próbek Cp_K i kwas sinapinowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_K i kwas oddzielnie (teoretyczne, T)



Wykres 36. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla próbek zawierających Cp_M i kwas sinapinowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_M i kwas oddzielnie (teoretyczne, T)

Następnie obliczono maksymalne stężenia jonów $\Delta\text{Fe(II)}$ jakie mogą być wyeliminowane przez kwas sinapinowy w układzie bez udziału Cp_K lub Cp_M oraz w jej obecności. W tym celu obliczono odwrotności wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ i stężeń kwasu sinapinowego, a zależności między nimi przedstawiono na wykresach 37A i 38A (Aneks). Równania prostych, na podstawie których obliczono $\Delta\text{Fe(II)}_{\max}$ przedstawia tabela 10. Maksymalne stężenie Fe(II) , jakie może być wyeliminowane z układu wyłącznie przez kwas sinapinowy wynosi 0,40 $\mu\text{mol/l}$ przy zastosowanym początkowym stężeniu Fe(II) . Dodatek Cp wspomagał kwas sinapinowy w eliminowaniu wolnych jonów Fe(II) .

Cp [mg/l]	Cp_K		Cp_M	
	$y = ax + b^*$	$1/b = \Delta\text{Fe(II)}_{\max}$	$y = ax + b^*$	$1/b = \Delta\text{Fe(II)}_{\max}$
kwas sinapinowy	$y = 6,7516x + 2,3519$	0,40	$y = 2,3703x + 2,6991$	0,40
22,0	$y = 1,4839x + 0,7666$	1,30	$y = 0,2375x + 0,6377$	1,57
33,0	$y = 0,9363x + 0,5062$	1,97	$y = 0,0907x + 0,4582$	2,18
44,0	$y = 0,4068x + 0,3619$	2,76	$y = 0,0254x + 0,4229$	2,36
66,0	$y = 0,2129x + 0,3568$	2,80	$y = 0,0792x + 0,3471$	2,88

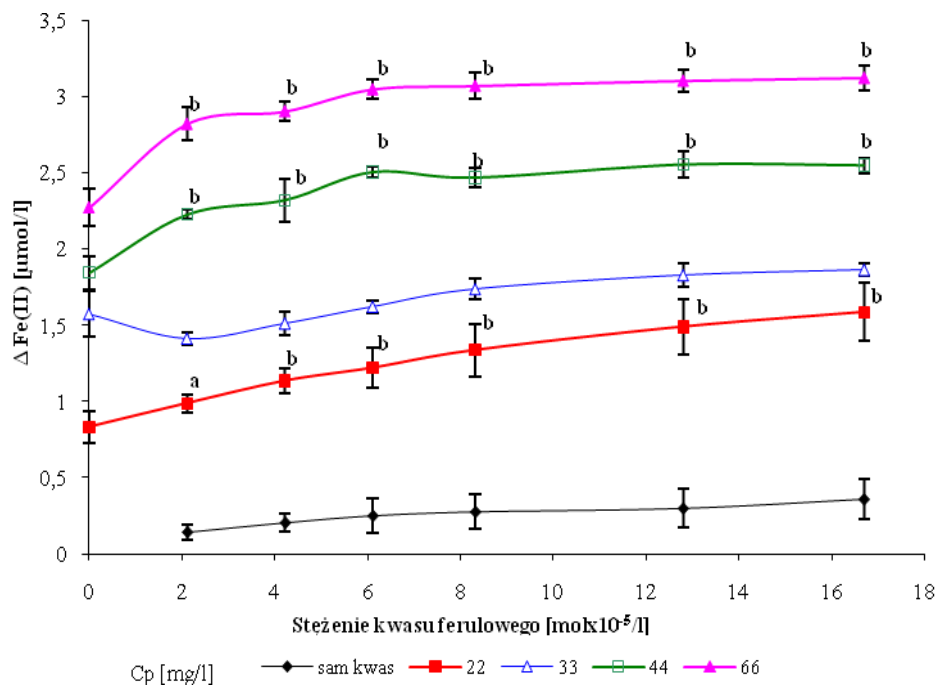
Tabela 10. $\Delta\text{Fe(II)}_{\max}$ dla układów zawierających kwas sinapinowy i Cp_K lub Cp_M .

* Równania prostych $y = ax + b$, czyli $1/\Delta\text{Fe(II)} = a(1/\text{kwas sinapinowy}) + b$, gdy $1/\text{kwas sinapinowy} \rightarrow 0$
Z założenia: $x=0 \rightarrow y=b$, czyli $1/\Delta\text{Fe(II)} = b \rightarrow 1/b = \Delta\text{Fe(II)}$ jest maksymalnym stężeniem Fe(II) jakie może zostać wyeliminowane w zastosowanym modelu badawczym

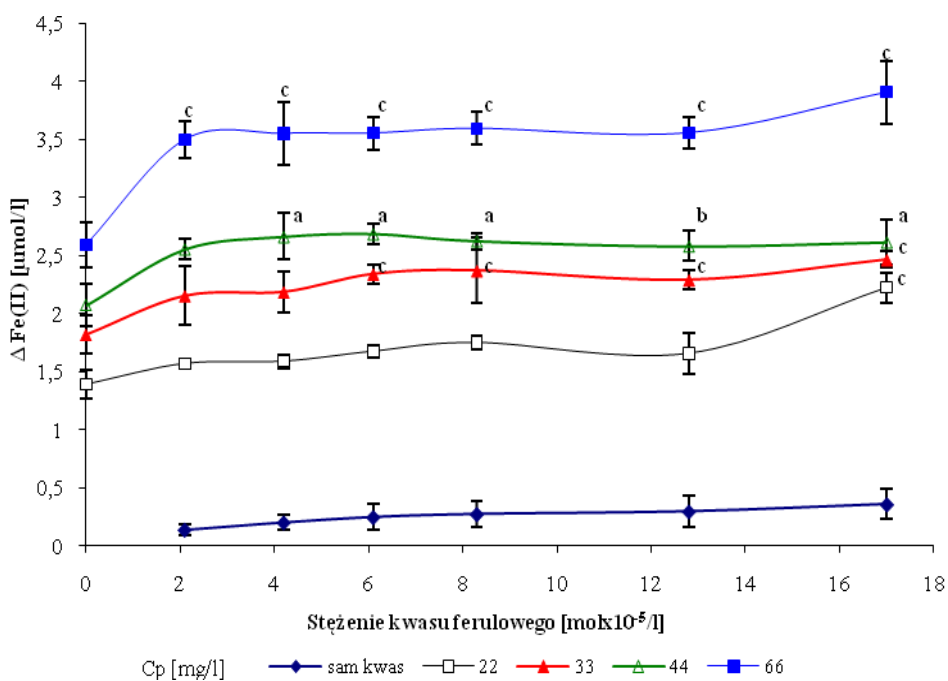
8. Wpływ kwasu ferulowego na aktywność ferroksoydazową Cp wyizolowanej z osocza krwiodawców i chorych z PMNT

W kolejnym etapie oceniono zdolność kwasu ferulowego do eliminowania jonów Fe(II) oraz jego wpływ na aktywność ferroksoydazową Cp_K oraz Cp_M (wykres 39 i 40). Kwas ferulowy wykazał niewielką zdolność do eliminowania Fe(II). Dodatek kwasu ferulowego do 22, 44 i 66 mg/l Cp_K wpłynął na wzrost $\Delta\text{Fe(II)}$ w analizowanym zakresie stężeń (wykres 39). Dodatek kwasu ferulowego w zakresie stężeń 6,0-17,0 mol $\times 10^{-5}$ /l do 33 mg/l Cp_M spowodował wzrost $\Delta\text{Fe(II)}$ (wykres 40). W przypadku 66 mg/l Cp_M dodatek kwasu ferulowego wpłynął na wzrost $\Delta\text{Fe(II)}$ w analizowanym zakresie stężeń. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ zależą również od stężenia Cp_K oraz Cp_M w układzie, co obrazują wykresy 39A i 40A (Aneks).

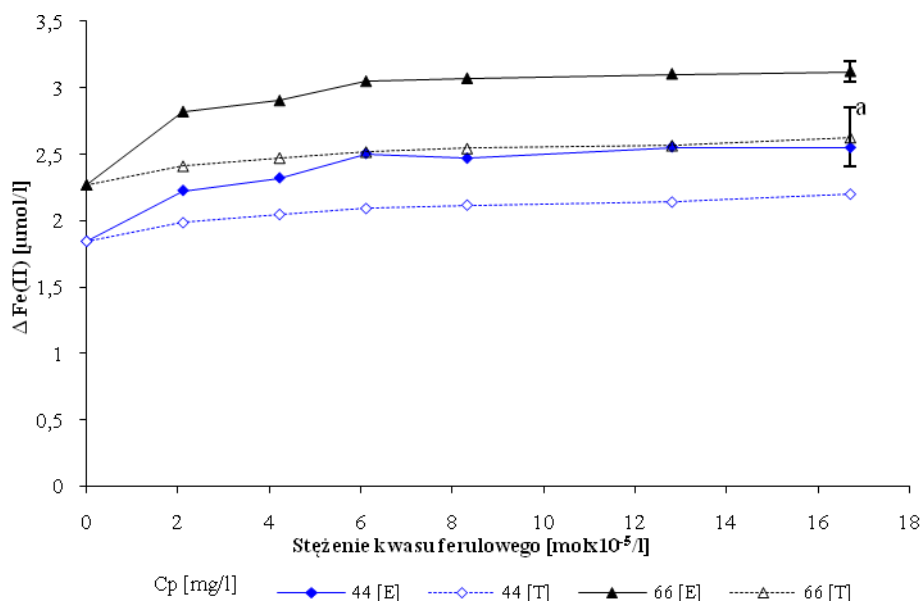
Następnie porównano wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ E i T uzyskanych dla 44 i 66 mg/l Cp_K i Cp_M w obecności kwasu ferulowego (wykres 41 i 42). Stwierdzono, iż wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ T są z namiennie niższe z w porównaniu z $\Delta\text{Fe(II)}$ E dla najwyższego stężenia kwasu i 66 mg/l Cp_K oraz Cp_M.



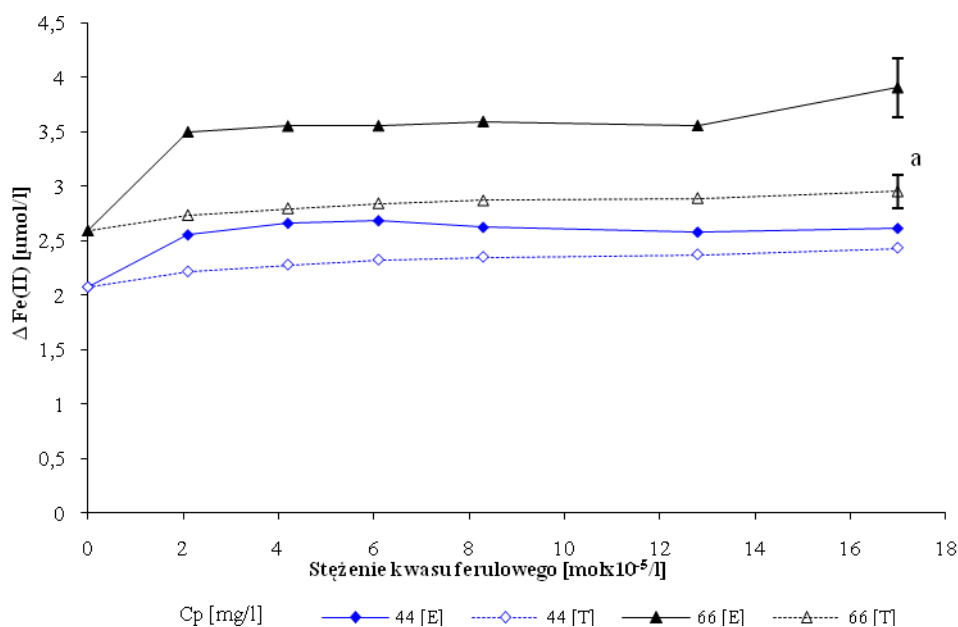
Wykres 39. Wpływ kwasu ferulowego na aktywność ferroksydazową Cp_K .
różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym wyłącznie Cp_K
a - $p < 0,01$ **b** - $p < 0,001$



Wykres 40. Wpływ kwasu ferulowego na aktywność Cp_M
Różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym wyłącznie Cp_M :
b - $p < 0,05$ **c** - $p < 0,001$ **a** - $p < 0,01$



Wykres 41. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla próbek zawierających Cp_K i kwas ferulowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_K i kwas oddzielnie (teoretyczne, T)
różnica istotna statystycznie w porównaniu $\Delta\text{Fe(II)}$ E dla najwyższego stężenia kwasu ferulowego
a - $p \leq 0,05$



Wykres 42. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla próbek zawierających Cp_M i kwas ferulowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_M i kwas oddzielnie (teoretyczne, T)
różnica istotna statystycznie w porównaniu $\Delta\text{Fe(II)}$ E dla najwyższego stężenia kwasu ferulowego
a - $p \leq 0,05$

Następnie obliczono maksymalne stężenia jonów Fe(II) jakie mogą być wyeliminowane przez kwas ferulowy w układzie bez udziału C_{pK} lub C_{pM} oraz w jej obecności. W tym celu obliczono odwrotności wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ i stężeń kwasu ferulowego, a zależności między nimi przedstawiono na wykresach 43A i 44A (Aneks). Równania prostych, na podstawie których obliczono $\Delta\text{Fe(II)}_{\max}$ przedstawia tabela 11. Maksymalne stężenie Fe(II) jakie może być wyeliminowane z układu wyłącznie przez kwas ferulowy wynosi 0,41 $\mu\text{mol/l}$ przy zastosowanym początkowym w stężeniu Fe(II). Dodatek Cp istotnie wspomagał udział kwasu ferulowego w eliminowaniu wolnych jonów Fe(II).

Cp [mg/l]	Cp _K		Cp _M	
	$y = ax + b^*$	$1/b = \Delta\text{Fe(II)}_{\max}$	$y = ax + b^*$	$1/b = \Delta\text{Fe(II)}_{\max}$
kwas ferulowy	$y = 9,879x + 2,4191$	0,41	$y = 9,879x + 2,4191$	0,41
22,0	$y = 0,8821x + 0,6282$	1,59	$y = 0,2784x + 0,5286$	1,89
33,0	$y = 0,4186x + 0,5291$	1,89	$y = 0,119x + 0,4131$	2,42
44,0	$y = 0,1453x + 0,3842$	2,60	$y = 0,017x + 0,3785$	2,64
66,0	$y = 0,0863x + 0,3163$	3,16	$y = 0,0405x + 0,2698$	3,71

Tabela 11. $\Delta\text{Fe(II)}_{\max}$ dla układów zawierających kwas ferulowy i C_{pK} lub C_{pM}

* Równania prostych $y = ax + b$, czyli $1/\Delta\text{Fe(II)} = a(1/\text{kwas ferulowy}) + b$, gdy $1/\text{kwas ferulowy} \rightarrow 0$
Z założenia: $x=0 \rightarrow y=b$, czyli $1/\Delta\text{Fe(II)} = b \rightarrow 1/b = \Delta\text{Fe(II)}$ jest maksymalnym stężeniem Fe(II) jakie może zostać wyeliminowane w zastosowanym modelu badawczym

9. Utlenianie Fe(II) w obecności kwasów fenolowych

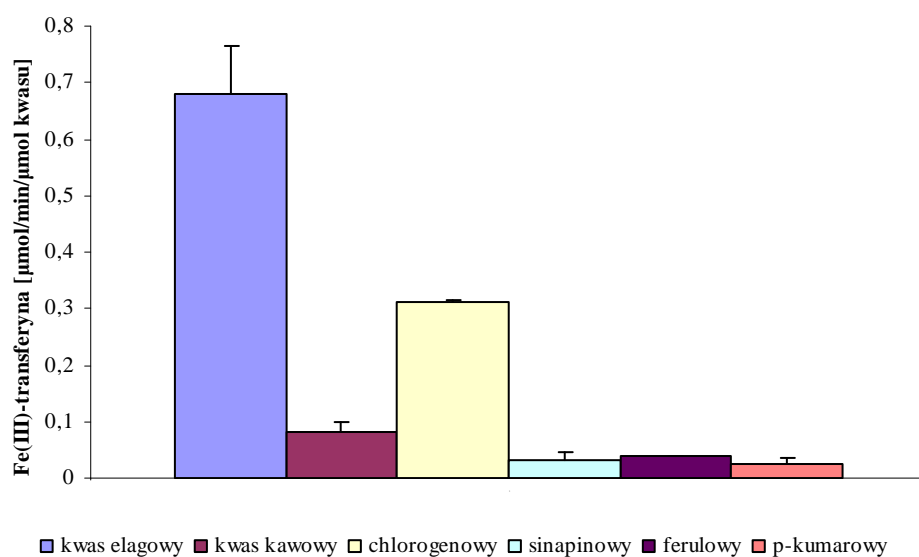
W kolejnym etapie badań oceniano zdolność kwasów fenolowych do utleniania jonów Fe(II) i tworzenia kompleksu Fe(III)-transferyna. Wyniki przedstawiające stężenie powstałego połączenia Fe(III)–transferyna zestawiono na wykresie 45 w zależności od zastosowanej proporcji molowej Fe(II) i kwasu fenolowego. Z poniższych wykresów wynika, iż największą zdolnością do utleniania jonów Fe(II) oraz tworzenia kompleksu Fe(III)-transferyna charakteryzuje się kwas elagowy oraz kwas chlorogenowy. Mniejszą zdolność zaobserwowano w przypadku kwasu kawowego. Natomiast kwas ferulowy, sinapinowy oraz p-kumarowy wykazały porównywalne i niewielkie zdolności do utleniania jonów Fe(II).

Utlenianie jonów Fe(II) przez kwasy fenolowe oceniano zależnie od ich struktury, liczby grup –OH i ugrupowań *orto*-OH. Z tabeli 10 wynika, że kwas elagowy i kwas chlorogenowy, zawierające największą liczbę grup hydroksylowych oraz charakteryzujące się obecnością dwóch ugrupowań *orto*-OH wykazują największą zdolność do utleniania jonów Fe(II).

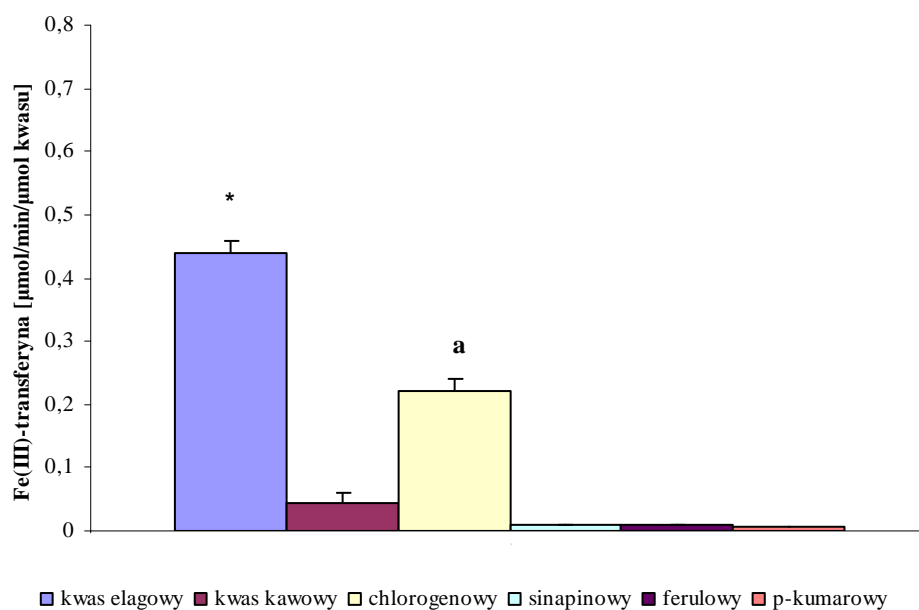
Kwas fenolowy	Liczba ugrupowań <i>orto</i> -OH	Ilość grup -OH	Fe(III)-transferyna [$\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{mol}$ kwasu]	
			proporcja 6:1	proporcja 1:1
elagowy	2	4	0,68	0,43
chlorogenowy	2	5	0,31	0,21
kawowy	1	2	0,08	0,04
sinapinowy	-	1	0,03	0,008
ferulowy	-	1	0,04	0,008
p-kumarowy	-	1	0,02	0,005

Tabela 12. Porównanie zdolności utleniania Fe(II) przez kwasy fenolowe w zależności od ilości par grup –OH w położeniu *orto*.

A



B



Wykres 45. Tworzenie kompleksu Fe(III)-transferyna w wyniku utleniania Fe(II) przez kwasy fenolowe przy proporcji molowej Fe(II) do kwasu fenolowego 6:1 (A) i proporcji 1:1 (B).

* - różnica istotna między A i B dla kwasu elagowego, $p < 0,001$
 a - różnica istotna między A i B dla kwasu chlorogenowego, $p < 0,01$

10. Kompleksowanie jonów Fe(II) przez kwasy fenolowe

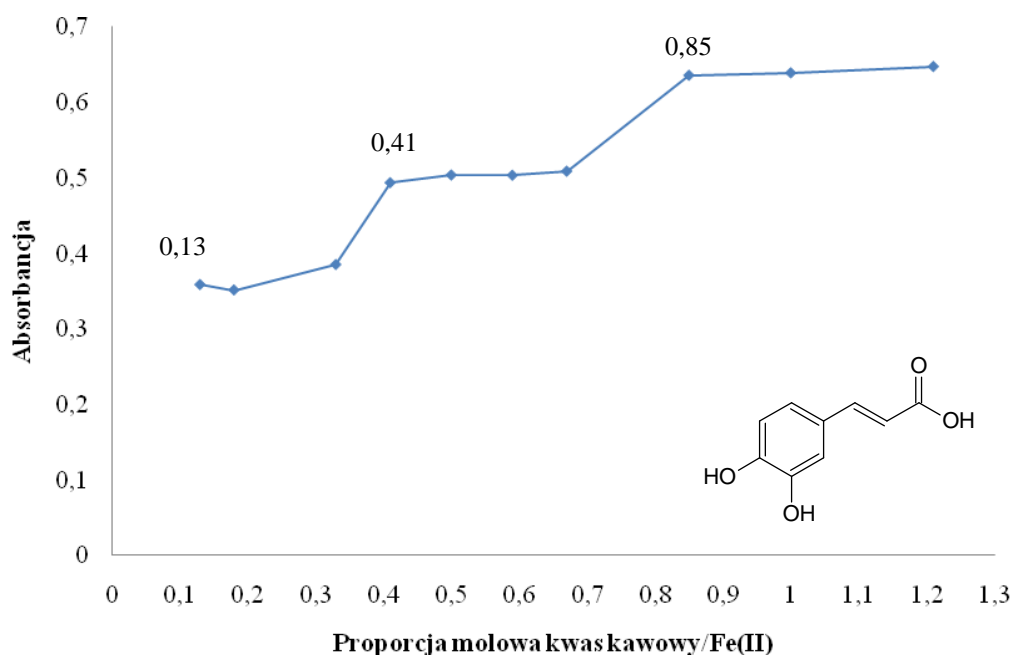
W kolejnym etapie badań oceniano zdolność kwasów fenolowych do kompleksowania jonów Fe(II). Do tego celu wykorzystano spektrometrię absorpcyjną przeprowadzając rejestrację widm w zakresie 200-700 nm. Maksima absorpcji charakterystyczne dla kwasów fenolowych oraz połączeń powstałych z jonami Fe(II) obserwowano w zakresie 290-370 nm zależnie od rodzaju kwasu fenolowego. Zaobserwowano przesunięcia maksimów o 5 do 15 nm w kierunku fal dłuższych. Wartości maksimów absorbancji oraz odpowiadające im długości fal, jakie uzyskano dla poszczególnych kwasów fenolowych w obecności oraz bez dodatku jonów Fe(II) zestawiono w tabelach 13-18. Natomiast na wykresach 46-51 przedstawiono zależności absorbancji od uzyskanych proporcji molowych kwas fenolowy/Fe(II).

Z poniższych danych wynika, iż dodatek jonów Fe(II) do roztworów zawierających kwas kawowy, sinapinowy, ferulowy, p-kumarowy oraz chlorogenowy spowodował wzrost wartości poszczególnych maksimów absorbancji w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla mieszanin nie zawierających jonów Fe(II). Odwrotną zależność zaobserwowano dla kwasu elagowego.

Zdolność wszystkich analizowanych kwasów do tworzenia związków kompleksowych z jonami Fe(II) zależna jest od proporcji molowej kwas fenolowy / Fe(II), na co wskazuje charakter krzywych przedstawionych na wykresach 46-51. W stosowanym zakresie stężeń, kwasy fenolowe i jony Fe(II) tworzyły kompleksy przy proporcjach molowych 0,13; 0,41 i 0,85, przy czym struktura kwasu fenolowego wydaje się mieć mniejsze znaczenie.

kwas bez Fe(II)	Stężenie kwasu kawowego [mol/l]			
	$4,3 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-5}$	$8,6 \times 10^{-5}$
λ [nm]	–	306	306	308
A	–	0,344	0,442	0,570
Proporcja molowa kwas/ Fe(II)	0,04	0,18	0,50	0,85
λ [nm]	–	308	310	312
A	–	0,350	0,504	0,635
Proporcja molowa kwas/ Fe(II)	0,06	0,33	0,59	1,00
λ [nm]	–	310	310	312
A	–	0,385	0,503	0,639
Proporcja molowa kwas/ Fe(II)	0,13	0,41	0,67	1,21
λ [nm]	308	310	310	312
A	0,358	0,493	0,508	0,647

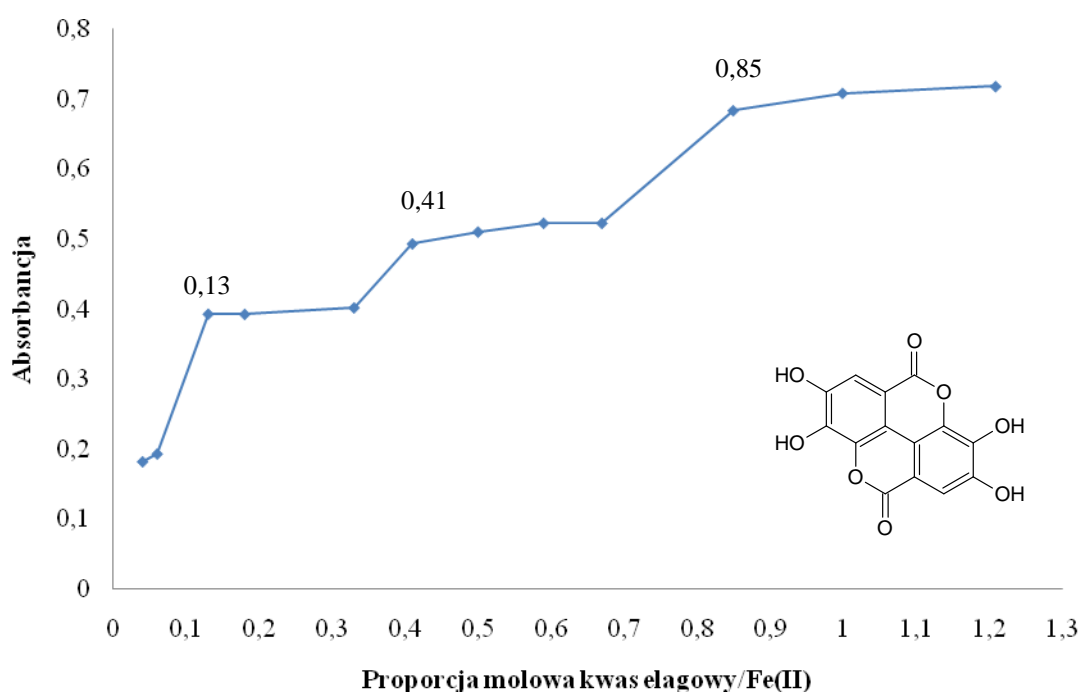
Tabela 13. Zestawienie wartości maksimów absorpcji i odpowiadających im długości fal dla kwasu kawowego zależnie od jego stężenia i obecności Fe(II).



Wykres 46. Wpływ proporcji molowej kwasu kawowego i jonów Fe(II) na jego właściwości kompleksujące.

kwasy bez Fe(II)	Stężenie kwasu elagowego [mol/l]			
	$4,3 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-5}$	$8,6 \times 10^{-5}$
λ [nm]	352	354	356	360
A	0,248	0,477	0,603	0,671
Proporcja molowa kwas/ Fe(II)	0,04	0,18	0,50	0,85
λ [nm]	358	306	362	366
A	0,182	0,392	0,510	0,684
Proporcja molowa kwas/ Fe(II)	0,06	0,33	0,59	1,00
λ [nm]	360	360	362	366
A	0,193	0,402	0,523	0,708
Proporcja molowa kwas/ Fe(II)	0,13	0,41	0,67	1,21
λ [nm]	360	362	364	366
A	0,398	0,493	0,523	0,720

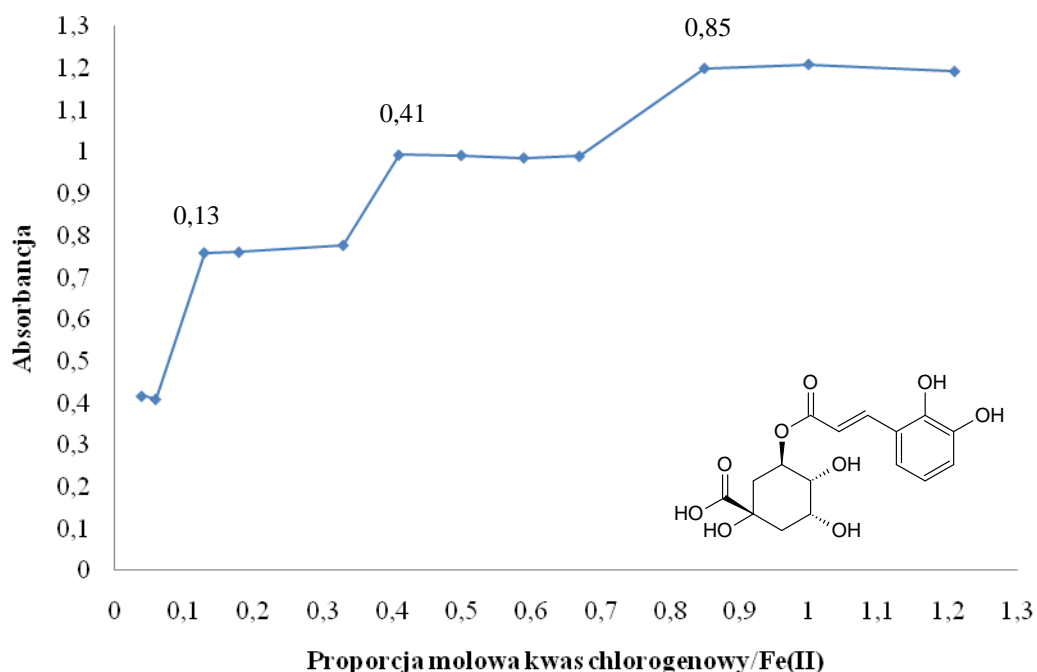
Tabela 14. Zestawienie wartości maksimów absorpcji i odpowiadających im długości fal dla kwasu elagowego zależnie od jego stężenia i obecności Fe(II).



Wykres 47. Wpływ proporcji molowej kwasu elagowego i jonów Fe(II) na jego właściwości kompleksujące.

	Stężenie kwasu chlorogenowego [mol/l]			
	$4,3 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-5}$	$8,6 \times 10^{-5}$
kwas bez Fe(II)				
λ [nm]	320	321	322	325
A	0,406	0,755	0,960	1,198
Proporcja molowa kwas/ Fe(II)	0,04	0,18	0,50	0,85
λ [nm]	320	322	322	325
A	0,417	0,760	0,992	1,199
Proporcja molowa kwas/Fe(II)	0,06	0,33	0,59	1,00
λ [nm]	320	322	322	325
A	0,410	0,777	0,986	1,209
Proporcja molowa kwas/Fe(II)	0,13	0,41	0,67	1,21
λ [nm]	320	322	322	325
A	0,760	0,992	0,990	1,192

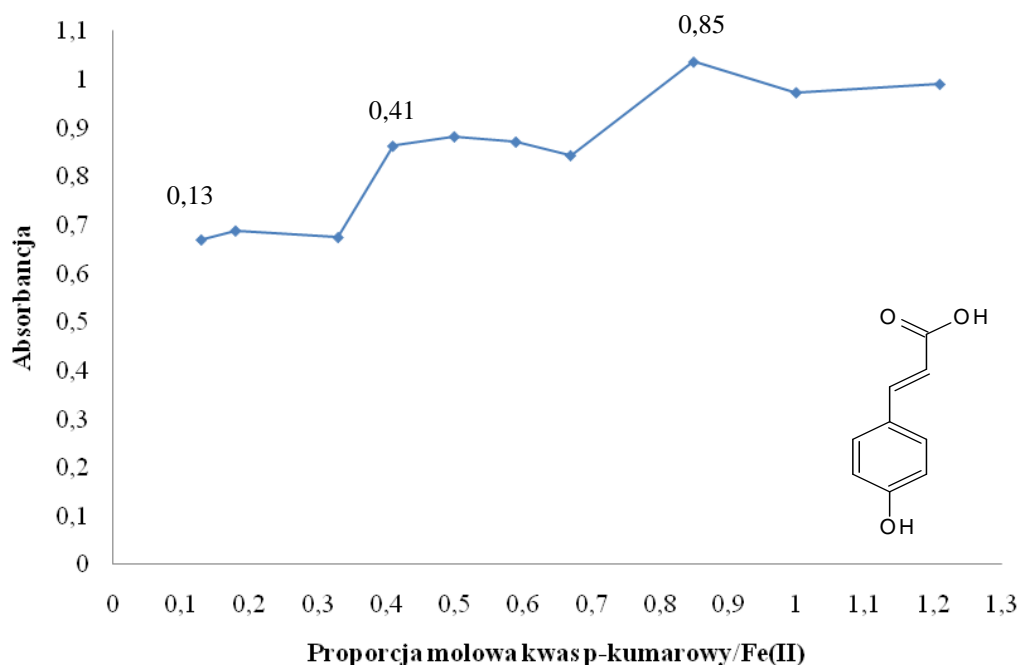
Tabela 15. Zestawienie wartości maksimów absorbancji i odpowiadających im długości fal dla kwasu chlorogenowego zależnie od jego stężenia i obecności Fe(II).



Wykres 48. Wpływ proporcji molowej kwasu chlorogenowego i jonów Fe(II) na jego właściwości kompleksujące.

kwasy bez Fe(II) λ [nm] A	Stężenie kwasu p-kumarowego [mol/l]			
	$4,3 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-5}$	$8,6 \times 10^{-5}$
Proporcja molowa kwas/Fe(II)	0,04	0,18	0,50	0,85
λ [nm] A	–	298 0,655	300 0,838	300 0,995
Proporcja molowa kwas/Fe(II)	0,06	0,33	0,59	1,00
λ [nm] A	–	300 0,690	302 0,883	302 1,037
Proporcja molowa kwas/ Fe(II)	0,13	0,41	0,67	1,21
λ [nm] A	298 0,670	302 0,863	302 0,844	304 1,027

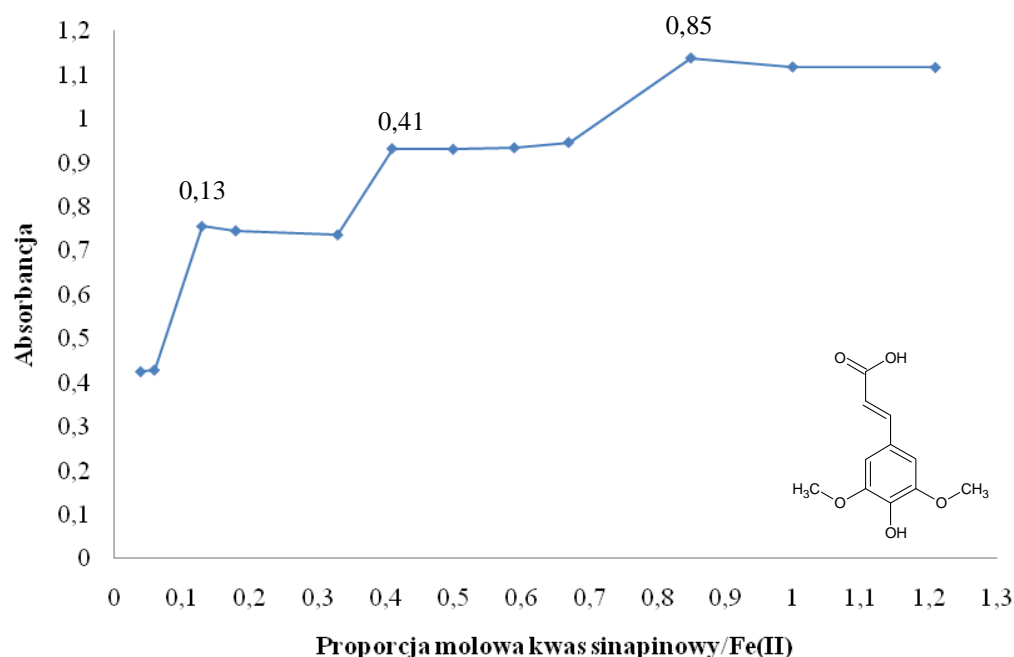
Tabela 16. Zestawienie wartości maksimum absorpcji i odpowiadających im długości fal dla kwasu p-kumarowego zależnie od jego stężenia i obecności Fe(II).



Wykres 49. Wpływ proporcji molowej kwasu p-kumarowego i jonów Fe(II) na właściwości kompleksujące.

kwas bez Fe(II)	Stężenie kwasu sinapinowego [mol/l]			
	$4,3 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-5}$	$8,6 \times 10^{-5}$
λ [nm]	302	304	306	310
A	0,418	0,720	0,915	1,097
Proporcja molowa kwas/ Fe(II)	0,04	0,18	0,50	0,85
λ [nm]	302	306	310	312
A	0,425	0,746	0,930	1,139
Proporcja molowa kwas/Fe⁺²	0,06	0,33	0,59	1,00
λ [nm]	302	308	310	314
A	0,429	0,737	0,934	1,118
Proporcja molowa kwas/ Fe(II)	0,13	0,41	0,67	1,21
λ [nm]	304	308	310	316
A	0,756	0,933	0,947	1,117

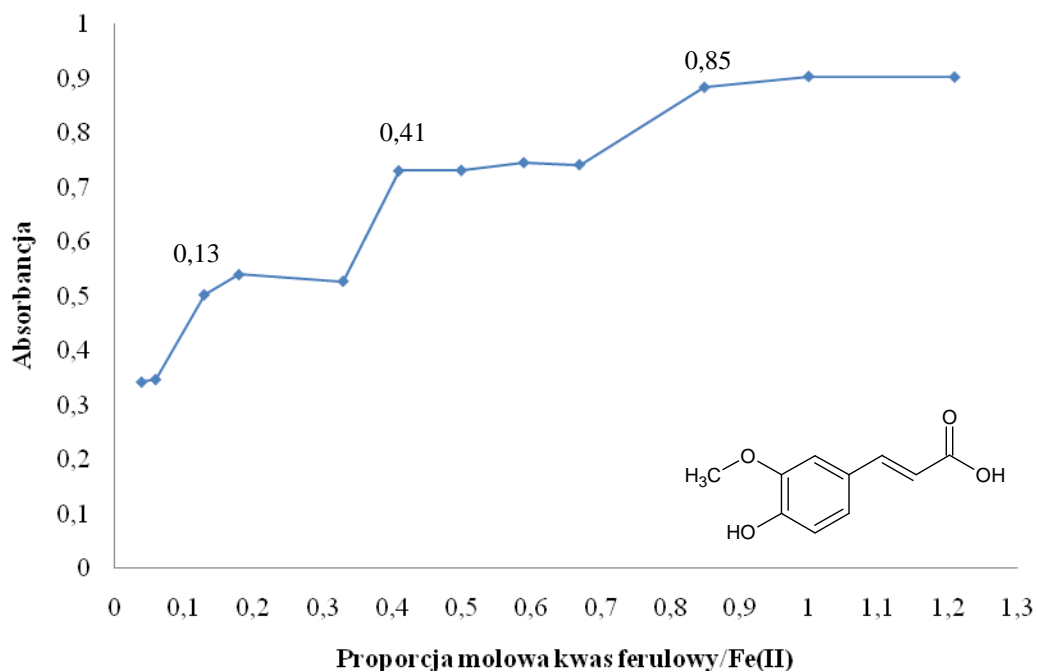
Tabela 17. Zestawienie wartości maksimum absorpcji i odpowiadających im długości fal dla kwasu sinapinowego zależnie od jego stężenia i obecności Fe(II).



Wykres 50. Wpływ proporcji molowej kwasu sinapinowego i jonów Fe(II) na jego właściwości kompleksujące.

kwasy bez Fe(II) λ [nm] A	Stężenie kwasu ferulowego [mol/l]			
	$4,3 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-5}$	$8,6 \times 10^{-5}$
Proporcja molowa kwas/Fe(II)	0,04	0,18	0,50	0,85
λ [nm] A	308 0,325	308 0,515	310 0,700	312 0,860
Proporcja molowa kwas/Fe(II)	0,06	0,33	0,59	1,00
λ [nm] A	308 0,342	310 0,540	312 0,731	312 0,884
Proporcja molowa kwas/Fe(II)	0,13	0,41	0,67	1,21
λ [nm] A	310 0,502	312 0,730	312 0,742	314 0,903

Tabela 18. Zestawienie wartości maksimum absorpcji i odpowiadających im długości fal dla kwasu ferulowego zależnie od jego stężenia i obecności Fe(II).



Wykres 51. Wpływ proporcji molowej kwasu ferulowego i jonów Fe(II) na jego właściwości kompleksujące.

VII. DYSKUSJA

Ceruloplazmina katalizuje w osoczu utlenianie jonów Fe(II) do mniej reaktywnych jonów Fe(III), wiązanych następnie przez apotransferynę lub ferrytynę. Ogranicza w ten sposób stężenie wolnych jonów Fe(II) i tym samym możliwość generowania wr i rft, zwłaszcza rodnika hydroksylowego osoczu. Aktywność ferrokсыdazowa Cp jest jedną z istotnych składowych systemu przeciwutleniaczy w organizmie człowieka.

Zwiększona produkcja wr i rft w trakcie trwania stresu oksydacyjnego może prowadzić do zwiększonego wykorzystania przeciwutleniaczy. Przeprowadzone badania wykazały, że rozwój przewlekłej miażdżycowej niedrożności tętnic kończyn dolnych wpływa na wzrost aktywności ferrokсыdazowej Cp_M w porównaniu z aktywnością Cp_K. Wskazuje to na jej udział w ochronie organizmu w trakcie reakcji ostrej fazy, co potwierdzają wcześniejsze badania [77]. Jednakże konieczność działania Cp w warunkach stresu oksydacyjnego powoduje obniżenie możliwości utleniania jonów Fe(II) do Fe(III). Wskazują na to mniejsze % zmiany stężenia Fe(II) wyeliminowanego przez Cp_M oraz wartość $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$, która jest dziesięciokrotnie niższa w porównaniu z wartością uzyskaną dla Cp_K. Wyniki te mogą wskazywać, iż w chorobach przewlekłych struktura białka lub stan utlenienia jonów miedzi odpowiedzialnych za aktywność ferrokсыdazową Cp, może ulec modyfikacji. Rozwój miażdżycowej niedrożności tętnic kończyn dolnych u pacjentów, z osocza których wyizolowano Cp, powodował zwiększone wykorzystanie przeciwutleniających możliwości enzymu.

Skuteczność działania endogennych przeciwutleniaczy mogą zwiększać egzogenne substancje o podobnym działaniu. Wykazano, iż związki polifenolowe obecne w ekstrakcie z pestek maliny mogą wspomagać ceruloplazminę w eliminowaniu jonów Fe(II), co potwierdzają wcześniejsze badania [110]. Wydaje się jednak, że nie jest to efekt bezpośredniego oddziaływania tej grupy związków na enzym, ale ich wzajemnego współdziałania w eliminowaniu jonów Fe(II) z badanego układu. Efekt ten zaobserwowano przede wszystkim dla niższych stężeń Cp_K oraz Cp_M. Ze wzrostem stężenia ekstraktu jak również ceruloplazminy prawdopodobnie wzmagają się ich współzawodnictwo o substrat, jakim są jony Fe(II), co przejawia się zbliżonymi wartościami $\Delta\text{Fe(II)}$.

Współdziałanie przeciwutleniaczy egzogennych z endogennymi nie jest dostatecznie zbadane i jedynie autorzy nielicznych prac sugerują, że różne związki polifenolowe oddziałują na enzymy według podobnego mechanizmu. Wykazano między innymi, że kurkumina (dimer kwasu ferulowego) i kwercetyna (flawonol) powodują wzrost aktywności

GPx, SOD, CAT *in vivo* i *in vitro* [70, 71]. Molina i współpracownicy [72] zaobserwowali, że długotrwałe podawanie etanolu myszom spowodowało znaczący wzrost stężenia utlenionego glutationu (GSSG), wzmagало proces peroksydacji lipidów, przy równoczesnym obniżeniu aktywności CAT, SOD i GPx. Suplementacja kwercetyny przez podawaniem etanolu wpłynęła na wzrost aktywności CAT i GPx, a także na wzrost stężenia GSH i zmniejszenie stężenia GSSG. Choć mechanizm nie został poznany, przypuszcza się, iż jest to wynik współdziałania kwercetyny i GPx, czego potwierdzeniem może być wzrost stężenia GSH silnie związany ze podawaniem kwercetyny oraz indukowanie wzrostu aktywności GPx przez glutation.

Jak wykazały przeprowadzone badania, włączenie egzogennej przeciwutleniacza, EPM lub kwasów fenolowych, do układu zawierającego Cp prowadzi do zmiany jej aktywności ferroksozydazowej. Stwierdzono, że wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla układu zawierającego jednocześnie oba przeciwutleniacze (E) różniły się od wartości obliczonych jako suma $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskanych dla układów zawierających każdy z przeciwutleniaczy osobno (T). Okazuje się, że zarówno Cp jak i ekstrakt wykazują znacznie większą zdolność do eliminowania jonów Fe(II), kiedy działają osobno. Zależne to jest również od pochodzenia Cp. W przypadku Cp_K dodatek EPM zmniejsza zdolność całego układu do eliminowania jonów Fe(II). Zwiększanie stężenia Cp_K może więc ograniczać udział EPM w eliminowaniu jonów Fe(II). Można przypuszczać, iż dodanie do układu Cp_K w stężeniach większych od zastosowanych w badaniach, mogłoby całkowicie zniwelować różnice między $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskanymi w eksperymencie i tymi, które wyznaczono by teoretycznie. Natomiast w przypadku układu zawierającego Cp_M, dodatek EPM zwiększa stężenie eliminowanych z układu jonów Fe(II). Pomimo tego, iż aktywność Cp_M jest wyższa w porównaniu z Cp_K, to w układzie zawierającym Cp_M i EPM właśnie EPM wydaje się mieć większy wpływ na eliminowanie jonów Fe(II). Możliwe również, że modyfikacja strukturalna części białkowej Cp_M lub zmiana stopnia utleniania jonów Cu, nie sprzyja Cp_M w konkurowaniu z EPM o substrat, jakim są jony Fe(II).

W związku z tymi rozważaniami obliczono maksymalne stężenia Fe(II), jakie może być wyeliminowane przez EPM bez udziału Cp_K lub Cp_M, oraz w jej obecności w zastosowanym układzie. Okazało się, iż $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$, jakie może osiągnąć sam ekstrakt jest mniejsze w porównaniu z tymi, jakie obliczono w obecności Cp_K oraz Cp_M. Można przypuszczać, iż wpływ na wartość $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$, jaką uzyskano dla samego ekstraktu, miał jego skład, a więc obecność nie tylko związków polifenolowych, ale i innych, dzięki którym tworzy on dynamiczny układ redoks. Biorąc pod uwagę, że w układzie takim może dojść

do utlenienia jonów Fe(II) do Fe(III), trudno przewidzieć, jaki typ oddziaływań miał w nim miejsce. Dodatek Cp_K oraz Cp_M do układu zawierającego EPM spowodował wzrost $\Delta Fe(II)_{max}$, co może świadczyć o ujawniającej się aktywności ferroksoydazowej Cp wspomagającej działanie ekstraktu.

Mimo, iż wielokrotnie udowodniono korzystne właściwości związków polifenolowych, tematyka ich współdziałania z innymi przeciwutleniaczami egzo- i endogennymi rzadko jest podejmowana. Jeżeli chodzi o ceruloplazminę, to szczególnie istotne wydają się być wyniki wskazujące na jej współdziałanie z innym antyoksydantem endogennym – dysmutazą ponadtlenkową. We wcześniejszych badaniach wykazano, iż niedokrwienie krytyczne u mężczyzn z miażdżycą tętnic kończyn dolnych wywiera istotny wpływ na aktywność Cp w osoczu oraz aktywność Cu,Zn-SOD w erytrocytach [69]. Wzrost aktywności Cp oraz stężenia Cu w surowicy tych chorych w porównaniu z grupą kontrolną związany jest reakcją ostrej fazy towarzyszącą zwłaszcza ostremu niedokrwieniu [77]. Natomiast wzrost aktywności Cu,Zn-SOD w erytrocytach wystąpił jedynie w niedokrwieniu umiarkowanym, a jej nagły spadek w niedokrwieniu krytycznym prawdopodobnie związany był z jego zwiększonym wykorzystaniem lub zmniejszoną syntezą białka enzymatycznego. Można przypuszczać, iż w niedokrwieniu krytycznym to właśnie Cp przejmuje rolę głównego przeciwutleniacza we krwi.

Opierając się na danych literaturowych oraz własnych wynikach można przypuszczać, że stosowanie ekstraktów bogatych w związki polifenolowe mogłoby wspomagać ceruloplazminę w eliminowaniu jonów Fe(II) i ograniczać ich udział w procesie generowania wr i rft zwłaszcza w sytuacji zwiększonego wykorzystania przeciwutleniaczy endogennych.

W kolejnym etapie badań oceniano zdolność wybranych kwasów fenolowych do eliminowania jonów Fe(II). Kwasy te różniły się budową, głównie liczbą grup hydroksylowych w cząsteczce, ich wzajemnym ułożeniem, obecnością jednego lub więcej pierścieni aromatycznych. Należało spodziewać się więc różnic w ich reaktywności wobec jonów Fe(II) i ceruloplazminy. Wydaje się zasadne przypuszczenie, iż efekt ten wynika ze współdziałania kwasów, zwłaszcza kwasu kawowego, elagowego i chlorogenowego, z ceruloplazminą w eliminowaniu jonów Fe(II), niż ich bezpośredniego oddziaływania na enzym. Zaobserwowano wysoki wzrost $\Delta Fe(II)$ już przy dodatku najniższych stężeń tych kwasów do układów o stałym stężeniu Cp_K oraz Cp_M . Natomiast ze wzrostem stężenia tych kwasów, jak również ceruloplazminy, przy stałej puli jonów Fe(II) prawdopodobnie wzrasta ich współzawodnictwo o substrat, co przejawia się niewielkimi różnicami między

wartościami $\Delta\text{Fe(II)}$ przy wyższych stężeniach kwasów i Cp. Wykazano także, iż dla najwyższych stężeń wyżej wymienionych kwasów w obecności Cp_K lub Cp_M, wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ T są istotnie wyższe od $\Delta\text{Fe(II)}$ E. Należy sądzić, iż dodatek kwasu kawowego, kwasu elagowego lub kwasu chlorogenowego do Cp_K oraz Cp_M zmniejsza zdolność do eliminowania jonów Fe(II) przez cały układ. Podobnie jak w przypadku EPM, zarówno Cp jak i kwasy te wykazują znacznie większą zdolność do eliminowania jonów Fe(II), kiedy działają osobno. Wydaje się, iż celowe byłoby zastosowanie niższych stężeń kwasu kawowego, elagowego lub chlorogenowego by wspomagać Cp_K lub Cp_M w eliminowaniu Fe(II) z układu. Efekt jest jak najbardziej pożądanym szczególnie dla działania Cp_M, ze względu na fakt, iż została ona wyizolowana z osocza osób z PMNT, a co za tym idzie jej struktura mogła ulec modyfikacjom.

Wyznaczenie $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$ również pozwoliło wykazać, że Cp znacznie ogranicza udział kwasów kawowego, elagowego i chlorogenowego w eliminowaniu Fe(II). Wprowadzenie Cp już w najniższym zastosowanym stężeniu wpłynęło na znaczne obniżenie wartości $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$ dla tych kwasów fenolowych, zwłaszcza dla kwasu kawowego, który wykazywał najwyższą zdolność do eliminowania Fe(II) w porównaniu z kwasem elagowym i kwasem chlorogenowym.

Kolejne trzy kwasy fenolowe, a mianowicie sinapinowy, p-kumarowy oraz ferulowy, wykazały znacznie mniejsze zdolności do eliminowania wolnych jonów Fe(II). Można przypuszczać, iż na ich zdolność do eliminowania jonów Fe(II) największy wpływ ma struktura, a w szczególności liczba grup hydroksylowych i ich wzajemne położenie względem siebie, gdyż kwasy te posiadają tylko jedną grupę -OH. Brak ugrupowań *orto* hydroksylowych w ich strukturach jest prawdopodobnie przyczyną ich niewielkiej zdolności do eliminowania Fe(II). Można więc sugerować, iż kwasy te wcale lub w bardzo nieznacznym stopniu mogą wspomagać Cp w usuwaniu jonów Fe(II). Wykazano także, iż dla najwyższych stężeń kwasu ferulowego oraz 66 mg/l Cp_K i Cp_M, a także kwasu p-kumarowego wraz z 66 mg/l Cp_M wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ T są istotnie niższe w porównaniu z wartościami $\Delta\text{Fe(II)}$ E. Należy przypuszczać, iż dodatek tych kwasów do Cp_K oraz Cp_M w niewielkim stopniu wspomaga układ w eliminowaniu jonów Fe(II) i to właśnie Cp odgrywa decydującą rolę w obniżaniu stężenia wolnych jonów Fe(II).

Niewielkie wartości $\Delta\text{Fe(II)}_{\text{max}}$, jakie uzyskano dla kwasu sinapinowego, kwasu ferulowego oraz kwasu p-kumarowego potwierdzają wcześniejsze przypuszczenia o ich niewielkiej zdolności do eliminowania wolnych jonów Fe(II). Natomiast dodatek Cp_K

oraz Cp_M do układu zawierającego jeden z tych kwasów powodował wzrost $\Delta Fe(II)_{max}$, co może świadczyć o wspomagającym działaniu ceruloplazminy.

Przeprowadzona ocena wpływu EPM oraz badanych kwasów fenolowych na aktywność feroksydazową Cp pozwala ustalić następującą kolejność w eliminowaniu jonów Fe(II): kwas kawowy > kwas elagowy > kwas chlorogenowy > EPM > kwas ferulowy \approx kwas p-kumarowy = kwas sinapinowy.

Przystępując do badań zakładano, iż jony Fe(II) mogą być eliminowane przez wybrane kwasy fenolowe głównie poprzez kompleksowanie. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują jednak, iż obok tworzenia kompleksów kwas fenolowy:Fe(II) ważnym mechanizmem eliminowania jonów Fe(II) jest ich utlenianie. Zastosowanie metody, w której apotransferyna wiąże jony Fe(III), powstające w obecności kwasów fenolowych, pozwoliło wykazać, że część jonów Fe(II) wprowadzonych do badanego układu ulega utlenieniu. Nie stwierdzono jednak, czy dochodzi do autoutleniania jonów Fe(II) czy też kwasy fenolowe uczestniczą w tym procesie jako utleniacze. Potwierdzono jedynie, że w obecności kwasu elagowego, chlorogenowego oraz kawowego powstaje więcej kompleksu transferyna:Fe(III) niż w obecności w kwasu sinapinowego, ferulowego lub p-kumarowego.

Doniesienia literaturowe wskazują, iż kwasy fenolowe, w których strukturze występuje ugrupowanie gallolowe (3 sąsiadujące grupy -OH) sprzyjają autoutlenianiu jonów Fe(II). Kwasy, które w swej strukturze zawierają grupę katecholową i karboksylową zamiast grupy gallolowej wzmagają ten proces [32]. Strukturę taką posiadają właśnie kwas kawowy i kwas chlorogenowy, w obecności których stwierdzono największe stężenie kompleksu transferyna:Fe(III). Szczególną uwagę zwracają wyniki uzyskane dla kwasu elagowego. Nie jest on zaliczany do żadnej z wyżej omawianych grup kwasów, gdyż jest dimerem kwasu galusowego, a ten, jak wykazały badania Chvátalovej [32], jest związkami utleniającym jony Fe(II) z dużą wydajnością. Możliwe, że obecność aż dwóch ugrupowań *orto*-OH w strukturze kwasu elagowego sprzyja największemu utlenieniu jonów Fe(II).

Interesujące wydaje się to, iż kwasy zawierające jedną grupę -OH (3-hydroksybenzoesowy; 4-hydroksybenzoesowy oraz kwas 4-hydroksy-3-metoksybenzoesowy) ograniczają proces autooksydacji jonów Fe(II) ze zbliżoną efektywnością do kwasu askorbinowego. Te kwasy nie wykazały również zdolności do redukcji Fe(III). Wyniki własne potwierdzają te obserwacje. Co prawda kwas sinapinowy, ferulowy oraz p-kumarowy są pochodnymi kwasu cyjamonowego, a nie benzoesowego, to jednak

wszystkie zawierają tylko jedną grupę OH oraz/lub nie grupę metoksyłową, więc wydaje się, iż ta hipoteza jest słuszna także dla nich.

Analiza wyników własnych wskazuje również, że na zdolność kwasu fenolowego do utleniania jonów Fe(II) ma wpływ oprócz struktury również proporcja molowa Fe(II) do kwasu. Zastosowanie 6-cio krotnie większej proporcji molowej Fe(II)/kwas fenolowy znacznie bardziej sprzyjało utlenianiu Fe(II) i wiązaniu powstałych jonów Fe(III) przez apotransferynę niż przy mniejszej proporcji. Doniesienia literaturowe wskazują, iż kwasy fenolowe znacznie bardziej sprzyjają utlenianiu jonów Fe(II), gdy ich stężenie jest znacznie niższe od początkowego stężenia jonów Fe(II). Kwas kawowy i protokatechowy okazały się najlepszymi utleniaczami wtedy, gdy ich stężenie stanowiło zaledwie 0,4% stężenia początkowego jonów Fe(II) [32].

Na podstawie wyników własnych, a także doniesień literaturowych, można stwierdzić, iż kwasy fenolowe wykazują aktywność podobną do ferrokzydazowej. Podczas gdy jony Fe(III) są stosunkowo mało reaktywną formą żelaza w organizmie, jony Fe(II) generują rft, odpowiedzialne za peroksydację lipidów, białek i kwasów nukleinowych. Poza tym jony Fe(II) mogą przyłączyć się z cząsteczką O₂ i tworzyć wysoce reaktywny jon perferryloyowy (Fe⁺²-O₂). Wydaje się więc, że zdolność kwasów fenolowych do utleniania jonów Fe(II) do jonów Fe(III), umożliwiające następnie ich wiązanie przez transferynę, jest korzystnym mechanizmem mogącym wspomagać ceruloplazminę w zmniejszaniu puli wolnych jonów Fe(II) w organizmie.

Jednym z najszerzej dyskutowanych zagadnień dotyczących związków polifenolowych jest ich zdolność do kompleksowania jonów metali przejściowych. Zdolność tą ocenia się przede wszystkim wykorzystując widma kwasów uzyskane metodą spektroskopii UV-VIS, a także spektroskopii masowej. Doniesienia literaturowe wskazują, że dodanie jonów Fe(II) do roztworów kwasów fenolowych powoduje wzrost maksimów absorbancji [111]. Andjelković i współpracownicy oceniali zdolność kwasów fenolowych do tworzenia związków kompleksowych z Fe(II) na podstawie widm UV-VIS oraz stałych tworzenia kompleksów. Na widmach tych kwasów uzyskanych z udziałem jonów Fe(II) obserwowano wyższe wartości absorbancji w podobnym zakresie długości fali, a także dodatkowy pik w zakresie 450-650 nm. Wzrost wartości absorbancji w zakresie fal o długości 220-350 nm wskazuje na formowanie związków kompleksowych z Fe(II) [111, 112, 113].

Wyniki badań własnych wskazują, że na zdolność kwasów fenolowych do tworzenia związków kompleksowych z jonami żelaza ma wpływ ich struktura,

co potwierdzają doniesienia literaturowe. Związki, które należą do grupy pochodnych kwasu hydroksycynamonowego są lepszymi ligandami dla jonów Fe(II) niż pochodne kwasu hydroksybenzoowego. Różnica ta może mieć związek z występowaniem lub brakiem grupy etylenowej między pierścieniem benzenowym a grupą karboksylową w strukturach tych związków. Wydaje się, iż w przypadku kwasów hydroksybenzoowych przyłączenie grupy karboksylowej bezpośrednio do pierścienia może osłabiać ich zdolności do kompleksowania jonów metali [56]. Istotne znaczenie ma także obecność grup hydroksylowych. Kwas galusowy zawierający trzy grupy -OH przy sąsiednich atomach węgla wykazał nieoczekiwanie niższą zdolność do kompleksowania jonów Fe(II) niż kwasy zawierające dwie grupy -OH. Możliwe, że obecność tylko i wyłącznie grupy gallolowej w strukturze związku nie sprzyja kompleksowaniu jonów metali. Wyniki badań własnych wskazują, że związki zawierające jedną grupę -OH kompleksują jony Fe(II) w niewielkim stopniu (kwas p-kumarowy), a dodatkowa obecność ugrupowań metoksylo- wych jeszcze bardziej ten proces ogranicza (kwas ferulowy), co potwierdza wynik uzyskane przez Andjelković [111]. Większe zmiany absorbancji po dodaniu Fe(II) w stosunku do wartości uzyskanych dla samych kwasów zaobserwowano dla kwasu kawowego (*orto*-OH) i chlorogenowego (2 *orto*-OH).

W badaniach własnych zaobserwowano także niewielkie przesunięcia maksimów absorbancji od 5 do 15 nm w kierunku fal dłuższych po dodaniu jonów Fe(II) do układów zawierających kwasy fenolowe. Podobny efekt obserwował Moridani, który wykazał, iż dodatek jonów Fe(II), Fe(III) i Cu(II) do układu zawierającego deferipron (substancja czynna leków odpowiedzialnych za chelatowanie jonów żelaza) wpłynął na przesunięcie maksimów absorbancji w kierunku fal dłuższych o 5-20 nm [114].

Zdaniem innych autorów na zdolność związków polifenolowych do tworzenia kompleksów z jonami metali wpływa nie tylko ich struktura, ale również proporcja stężenia molowego kwasu do jonu metalu [32, 70, 111, 114]. Fernandez i współpracownicy wykazali, iż stosunek stężeń jonów metali do flawonoidów istotnie wpływa na zdolność do kompleksowania jonów metali [115]. Wykazał, iż analizowane flawonoidy (kwercetyna, kampferol, luteolina, myricetyna, naringenina) formują związki kompleksowe z jonami Fe(II) przy zachowaniu proporcji stężeń 1:1, a z Fe(III) 1:2. Proponując mechanizm kompleksowania autorzy sugerują, iż flawonoidy zawierające grupy hydroksylowe w pozycjach 3, 5, 3' oraz 4, a także grupę karbonylową przyłączoną do C4 w pierścieniu C, mogą kompleksować jony metali odpowiednio między: C3-OH i 4=O, C5-OH i C4=O i między grupami hydroksylowymi pierścienia B. Ze względu na znacznie bardziej rozbu-

dowana strukturę, flawonoidy posiadają więcej ugrupowań mogących kompleksować jony Fe(II) niż badane w pracy kwasy fenolowe.

Wyniki badań własnych wskazują, iż zwiększanie proporcji molowej kwas fenolowy/Fe(II) sprzyja tworzeniu związków kompleksowych. Obserwuje się wzrost absorbancji i przesunięcie maksimum w kierunku fal dłuższych. Punkty przegięcia występujące na krzywych zależności absorbancji od proporcji molowych kwas fenolowy:Fe(II), przedstawionych na wykresach 46-51, pojawiają się niezależnie od rodzaju kwasu fenolowego przy proporcjach 0,13; 0,41 i 0,85. Mogą odpowiadać różnym połączeniom, jakie tworzy kwas fenolowy z jonami Fe(II). Dochodzi prawdopodobnie do stopniowego wysycenia miejsc koordynacyjnych jonów Fe(II) przez kwasy fenolowe, tworzenia związków kompleksowych o różnej trwałości i proporcji kwas fenolowy/Fe(II). Możliwe, iż pewne proporcje molowe sprzyjają tworzeniu się trwałych związków kompleksowych, choć należy również założyć tworzenie soli kwasów z jonami Fe(II) dzięki obecnym w nich grupom karboksylowym.

W związku z tym, iż badania własne wykazały, że kwasy fenolowe wykazują również zdolność do utleniania jonów Fe(II) do Fe(III) lub katalizowania tej reakcji, analiza widm UV-VIS nie dostarcza jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy w zastosowanym modelu badawczym w tworzeniu kompleksów biorą udział tylko jony Fe(II), czy również jony Fe(III). Wielu autorów udowodniło, iż związki polifenolowe wykazują większą zdolność do tworzenia kompleksów właśnie z jonami Fe(III) [115, 116]. Wykazano, iż w warunkach fizjologicznego pH katechole tworzą związki kompleksowe z jonami Fe(III) przy stosunku molowym 2:1, natomiast katechole charakteryzujące się niższym pK_a formują je z jonami Fe(II) przy zachowaniu proporcji 3:1 [114,117,118]. Niemniej jednak zdolność związków polifenolowych do kompleksowania obu form żelaza jest jak najbardziej pożądana ze względu na to, iż wielu autorów podkreśla, iż kompleksy zarówno jonów Fe(II) jak i Fe(III) nie katalizują reakcji Fentona [119].

VIII. WNIOSKI

1. Ekstrakt z pestek maliny podobnie jak kwasy fenolowe wykazują aktywność podobną do aktywności ferroksoydazowej ceruloplazminy, zmniejszając stężenie jonów Fe(II) w modelu *in vitro*.
2. Aktywność ferroksoydazowa ceruloplazminy, zarówno wyizolowanej z osocza krwiodawców jak i chorych z miażdżycą tętnic, ulega zmianie pod wpływem dodanego ekstraktu z pestek maliny lub kwasów fenolowych w sposób zależny od ich stężenia.
3. Ekstrakt z pestek maliny i kwasy fenolowe wykazują zdolność do eliminowania jonów Fe(II) zarówno na drodze ich utleniania jak i kompleksowania w następującej kolejności: kwas kawowy > kwas elagowy > kwas chlorogenowy > EPM > kwas ferulowy \approx kwas p-kumarowy = kwas sinapinowy.
4. Udział kwasów fenolowych w utlenianiu jonów Fe(II) zwiększa się ze wzrostem proporcji molowej Fe(II):kwas fenolowy, liczbą grup –OH i obecnością ugrupowań *orto*-OH w ich cząsteczce.
5. Zdolność kompleksowania jonów Fe(II) przez kwasy fenolowe zależy od proporcji molowej, a w mniejszym stopniu od ich struktury. Proporcje molowe, przy których tworzą się kompleksy kwas fenolowy:Fe(II) wskazują na zmianę ich składu i dążenie do wysycenia miejsc koordynacyjnych Fe(II) przez kwasy fenolowe.
6. Ceruloplazmina, zarówno Cp_K jak i Cp_M, skutecznie konkuruje o jony Fe(II) z kwasem kawowym, kwasem elagowym oraz kwasem chlorogenowym, mimo obecności w ich strukturach grup *orto*-OH.

IX. STRESZCZENIE

Ceruloplazmina (Cp) jest głównym przeciwutleniaczem osocza krwi, metaloproteiną wiążącą znaczną część jonów miedzi i wykazującą aktywność ferroksoydazową. Dzięki tej aktywności Cp reguluje metabolizm żelaza utleniając jony Fe(II) do Fe(III), które wiązane są następnie przez transferynę i ferrytynę. Zmniejszenie puli wolnych jonów żelaza w osoczu ogranicza ich udział w generowaniu wolnych rodników i reaktywnych form tlenu w reakcji Fentona i Habera-Weissa.

Eliminowanie z osocza wolnych jonów Fe(II) jak i Fe(III) przez związki polifenolowe może wspomagać układ przeciwutleniaczy organizmu w dezaktywacji wr i rft. Mechanizm ich współdziałania z przeciwutleniaczami endogennymi nie jest dostatecznie wyjaśniony.

Celem prezentowanej pracy jest próba odpowiedzi na pytanie, czy ekstrakt z pestek maliny (EPM), bogaty w związki polifenolowe, a także kwasy fenolowe (kwas kawowy, elagowy, chlorogenowy, sinapinowy, ferulowy i p-kumarowy) mogą wspomagać Cp w eliminowaniu wolnych jonów Fe(II) *in vitro*. W badaniach wykorzystano ceruloplazminę wyizolowaną z osocza chorych z przewlekłą miażdżycową niedrożnością tętnic kończyn dolnych (Cp_M), której aktywność ferroksoydazowa była większa od aktywności Cp uzyskanej z osocza krwiodawców (Cp_K).

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż EPM oraz wybrane kwasy fenolowe wykazują aktywność podobną do ferroksoydazowej, a ich zdolność do eliminowania wolnych jonów Fe(II) zmienia się w kolejności: kwas kawowy > kwas elagowy > kwas chlorogenowy > EPM > kwas ferulowy ≈ kwas p-kumarowy = kwas sinapinowy. Dodatek ekstraktu, a także kwasów fenolowych do układów zawierających Cp powodował dodatkowe zmniejszenie stężenia jonów Fe(II).

Wykazano również, iż na zdolność badanych kwasów do eliminowania jonów Fe(II) na drodze utleniania oraz kompleksowania ma wpływ zarówno ich struktura przestrzenna (w szczególności obecność grup *orto*-OH), jak również proporcja molowa kwasu do Fe(II). Kwas elagowy i chlorogenowy, posiadające dwa ugrupowania *orto*-OH i największą liczbę grup -OH (odpowiednio 4 i 5), wykazują największą zdolność utleniania Fe(II), zwłaszcza w proporcji molowej Fe(II):kwas 6:1. Zdolność kompleksowania jonów Fe(II) przez badane kwasy fenolowe zależy od proporcji molowej kwas: Fe(II), natomiast struktura kwasu fenolowego ma mniejsze znaczenie. W przyjętym zakresie stężeń kwasy fenolowe

i jony Fe(II) tworzą kompleksy przy proporcjach molowych 0,13; 0,41 i 0,85, co wskazuje, że ich skład ulega zmianom dążąc do wysycenia miejsc koordynacyjnych Fe(II).

W oparciu o wyniki przeprowadzonych badań stwierdzono, że EPM oraz badane kwasy fenolowe, zwłaszcza zawierające grupy hydroksylowe w układzie *orto* (katecholowym) jak kawowy, elagowy i chlorogenowy, wspomagają Cp w eliminowaniu wolnych jonów Fe(II). Wykazano, iż obie grupy przeciwutleniaczy, endo- i egzogenne, konkurują o substrat, jakim są wolne jony Fe(II), w sposób zależny od ich stężeń. Kwasy zawierające tylko jedną grupę hydroksylową, czyli ferulowy, p-kumarowy i sinapinowy, w niewielkim stopniu przyczyniają się do usuwania jonów Fe(II), a ich działanie w układzie z Cp jest wspomagane przez jej aktywność ferroksozydazową.

X. ABSTRACT

Ceruloplasmin (Cp) is the major antioxidant in plasma, protein that carries about 95% of the total copper. Multiple biochemical activities of ceruloplasmin have been described, including copper transport, oxidation of Fe(II) to Fe(III) for subsequent uptake by transferrin and ferritin. Reduction of pool of free Fe(II) ions by Cp prevents the generation of free radicals and reactive oxygen species by oxidation of Fe(II) thus inhibition the Haber-Weiss reaction.

The removal of both free Fe(II) and Fe(III) ions from blood plasma by polyphenols enhances the antioxidant system of the living organism. However, mechanism of the interaction between exo- and endogenous antioxidants is still under consideration.

The aim of the study was to investigate the effect of raspberry seed extract (RSE), which is rich in polyphenolic compounds, and phenolic acids (caffeic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, ellagic acid, sinapic acid and p-coumaric acid) on the ferroxidase activity of Cp *in vitro*. Ceruloplasmin was isolated from blood plasma of patients with atherosclerosis obliterans (Cp_M) and from healthy volunteers (Cp_K). The influence of chronic arterial occlusion of the lower limbs due to atherosclerosis was observed and the ferroxidase activity of Cp_M was found increased in comparison to Cp_K.

The RSE and phenolic acids demonstrated the ferroxidase-like activity, ie the ability to eliminate Fe(II) ions within the studied range in order of decreasing effectiveness: caffeic acid > ellagic acid > chlorogenic acid > RSE > ferulic acid ≈ p-coumaric acid = sinapic acid. The addition of RSE and phenolic acids to samples with constant amount of Cp reduced the concentration of Fe(II) ions.

It was shown that the ability of phenolic acids to eliminate Fe(II) ions by oxidation or chelation was connected with their structures, especially the presence of *orto*-OH groups. Furthermore, the effect of phenolic acid/Fe(II) ion molar ratio was observed. Ellagic acid and chlorogenic acid, which contain two *orto*-OH groups and the highest number of -OH groups (4 and 5, respectively), show the highest ability to eliminate Fe(II) ions, especially at Fe(II)/phenolic acid molar ratio 6:1. In the present study, it was also established that phenolic acid/ Fe(II) molar ratio influenced more significantly the formation of chelates than their structure. The complexes of phenolic acid and Fe(II) were formed at molar ratio 0,13; 0,41 and 0,85 showing the tendency to saturate coordination sites on Fe(II) ion.

In conclusion, it was shown in this study that RSE and phenolic acids reduced the concentration of Fe(II) ions, especially those containing the *ortho*-OH group (catechol group), ie caffeic acid, elagic acid and chlorogenic acid. However, the effect of RSE and phenolic acids at higher levels of both RSE or acids and Cp is limited by their competition for accessible amount of Fe(II) ions. Phenolic acids having only one –OH group, ie ferulic acid, *p*-cumarinic acid and sinapinic acid, are much less efficient in the removal of Fe(II) ions, and their low ferroxidase-like activity is enhanced by the presence of ceruloplasmin in the system.

XI. SPIS RYCIN

Ryc. 1. Struktura kwasów fenolowych.....	11
Ryc. 2. Struktura poszczególnych podklas flawonoidów.....	11
Ryc. 3. Podstawowa struktura flawonoidów	13
Ryc. 4. Mechanizm zmiatania anionorodnika ponadtlenkowego przez związek kompleksowy katechol:żelazo na przykładzie luteoliny	21
Ryc.5. Udział kwercetyny w generowaniu wolnych rodników w obecności O ₂ lub Fe(III)	23
Ryc.6. Współdziałanie witaminy C i E w zmiataniu wolnych rodników	27
Ryc.7. Struktura ceruloplazminy	34

XII. SPIS TABEL

Tabela 1. Aktywność oksydazowa ceruloplazminy (Cp) w surowicy oraz stężenia miedzi w surowicy i ścianie tętniczej mężczyzn z miażdżycą tętnic (MT), tętniakami aorty (TA) oraz w grupie kontrolnej.....	29
Tabela 2. Aktywność Cu,Zn-SOD w erytrocytach oraz aktywność oksydazowa ceruloplazminy (Cp) i stężenie miedzi w surowicy w krytycznym i umiarkowanym niedokrwieniu kończyn dolnych u mężczyzn z MT oraz w grupie kontrolne	30
Tabela 3. Wpływ stężenia Cp_K i Cp_M na wartości $\Delta Fe(II)$	49
Tabela 4. $\Delta Fe(II)_{max}$ dla układów zawierających Cp_K lub Cp_M	49
Tabela 5. $\Delta Fe(II)_{max}$ dla układów zawierających EPM i Cp_K lub Cp_M	53
Tabela 6. $\Delta Fe(II)_{max}$ dla układów zawierających kwas kawowy i Cp_K lub Cp_M	57
Tabela 7. $\Delta Fe(II)_{max}$ dla układów zawierających kwas elagowy i Cp_K lub Cp_M	61
Tabela 8. $\Delta Fe(II)_{max}$ dla układów zawierających kwas chlorogenowy i Cp_K lub Cp_M	65
Tabela 9. $\Delta Fe(II)_{max}$ dla układów zawierających kwas p-kumarowy i Cp_K lub Cp_M	69
Tabela 10. $\Delta Fe(II)_{max}$ dla układów zawierających kwas sinapinowy i Cp_K lub Cp_M	73
Tabela 11. $\Delta Fe(II)_{max}$ dla układów zawierających kwas ferulowy i Cp_K lub Cp_M	77
Tabela 12. Porównanie zdolności utleniania Fe(II) przez kwasy fenolowe w zależności od ilości par grup – OH w położeniu <i>orto</i>	78
Tabela 13. Zestawienie wartości maksimum absorpcji i odpowiadających im długości fal dla kwasu kawowego zależnie od jego stężenia i obecności Fe(II).....	81
Tabela 14. Zestawienie wartości maksimum absorpcji i odpowiadających im długości fal dla kwasu elagowego zależnie od jego stężenia i obecności Fe(II).....	82
Tabela 15. Zestawienie wartości maksimum absorpcji i odpowiadających im długości fal dla kwasu chlorogenowego zależnie od jego stężenia i obecności Fe(II).....	83
Tabela 16. Zestawienie wartości maksimum absorpcji i odpowiadających im długości fal dla kwasu p-kumarowego zależnie od jego stężenia i obecności Fe(II).....	84
Tabela 17. Zestawienie wartości maksimum absorpcji i odpowiadających im długości fal dla kwasu sinapinowego zależnie od jego stężenia i obecności Fe(II).....	85
Tabela 18. Zestawienie wartości maksimum absorpcji i odpowiadających im długości fal dla kwasu ferulowego zależnie od jego stężenia i obecności Fe(II).....	86

XIII. SPIS WYKRESÓW

Wykres 1. Wpływ stężenia C_{pK} i C_{pM} na jej aktywność ferroksoydazową.....	48
Wykres 3. Wpływ ekstraktu z pestek maliny na aktywność ferroksoydazową C_{pK}	51
Wykres 4. Wpływ ekstraktu z pestek maliny na aktywność ferroksoydazową C_{pM}	51
Wykres 5. Wartości $\Delta Fe(II)$ uzyskane dla prób zawierających C_{pK} i EPM (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta Fe(II)$ uzyskane w eksperymentach analizujących C_{pK} i EPM oddzielnie (teoretyczne, T).....	52
Wykres 6. Wartości $\Delta Fe(II)$ uzyskane dla prób zawierających C_{pM} i ekstrakt (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta Fe(II)$ uzyskane w eksperymentach analizujących C_{pM} i EPM oddzielnie (teoretyczne, T)	52
Wykres 9. Wpływ kwasu kawowego na aktywność ferroksoydazową C_{pK}	55
Wykres 10. Wpływ kwasu kawowego na aktywność ferroksoydazową C_{pM}	55
Wykres 11. Wartości $\Delta Fe(II)$ uzyskane dla prób zawierających C_{pK} i kwas kawowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta Fe(II)$ uzyskane w eksperymentach analizujących C_{pK} i kwas oddzielnie (teoretyczne, T).....	56
Wykres 12. Wartości $\Delta Fe(II)$ uzyskane dla prób zawierających C_{pM} i kwas kawowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta Fe(II)$ uzyskane w eksperymentach analizujących C_{pM} i kwas oddzielnie (teoretyczne, T).....	56
Wykres 15. Wpływ kwasu elagowego na aktywność ferroksoydazową C_{pK}	59
Wykres 16. Wpływ kwasu elagowego na aktywność ferroksoydazową C_{pM}	59
Wykres 17. Wartości $\Delta Fe(II)$ uzyskane dla prób zawierających C_{pK} i kwas elagowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta Fe(II)$ uzyskane w eksperymentach analizujących C_{pK} i kwas oddzielnie (teoretyczne, T).....	60
Wykres 18. Wartości $\Delta Fe(II)$ uzyskane dla prób zawierających C_{pM} i kwas elagowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta Fe(II)$ uzyskane w eksperymentach analizujących C_{pM} i kwas oddzielnie (teoretyczne, T).....	60
Wykres 21. Wpływ kwasu chlorogenowego na aktywność ferroksoydazową C_{pK}	63
Wykres 22. Wpływ kwasu chlorogenowego na aktywność ferroksoydazową C_{pM}	63
Wykres 23. Wartości $\Delta Fe(II)$ uzyskane dla prób C_{pK} i kwas chlorogenowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta Fe(II)$ uzyskane w eksperymentach analizujących C_{pK} i kwas oddzielnie (teoretyczne, T)	64
Wykres 24. Wartości $\Delta Fe(II)$ uzyskane dla prób zawierających C_{pM} i kwas chlorogenowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta Fe(II)$ uzyskane w eksperymentach analizujących C_{pM} i kwas oddzielnie (teoretyczne, T)	64
Wykres 27. Wpływ kwasu p-kumarowego na aktywność ferroksoydazową C_{pK}	67
Wykres 28. Wpływ kwasu p-kumarowego na aktywność ferroksoydazową C_{pM}	67
Wykres 29. Wartości $\Delta Fe(II)$ uzyskane dla prób zawierających C_{pK} i kwas p-kumarowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta Fe(II)$ uzyskane w eksperymentach analizujących C_{pK} i kwas oddzielnie (teoretyczne, T).....	68

Wykres 30. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla prób zawierających Cp_M i kwas p-kumarowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_M i kwas oddzielnie (teoretyczne, T).....	68
Wykres 33. Wpływ kwasu sinapinowego na aktywność ferroksoydazową Cp_K	71
Wykres 34. Wpływ kwasu sinapinowego na aktywność Cp_M	71
Wykres 35. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla prób zawierających Cp_K i kwas sinapinowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_K i kwas oddzielnie (teoretyczne, T).....	72
Wykres 36. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla prób zawierających Cp_M i kwas sinapinowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_M i kwas oddzielnie (teoretyczne, T).....	72
Wykres 39. Wpływ kwasu ferulowego na aktywność ferroksoydazową Cp_K	75
Wykres 40. Wpływ kwasu ferulowego na aktywność ferroksoydazową Cp_M	75
Wykres 41. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla prób zawierających Cp_K i kwas ferulowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_K i kwas oddzielnie (teoretyczne, T).....	76
Wykres 42. Wartości $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane dla prób Cp_M i kwas ferulowy (eksperymentalne, E) oraz sumy $\Delta\text{Fe(II)}$ uzyskane w eksperymentach analizujących Cp_M i kwas oddzielnie (teoretyczne, T).....	76
Wykres 45. Tworzenie kompleksu Fe(III) -transferyna w wyniku utleniania Fe(II) przez kwasy fenolowe przy proporcji molowej Fe(II) do kwasu fenolowego 6:1 (A) i proporcji 1:1 (B).....	79
Wykres 46. Wpływ proporcji molowej kwasu kawowego i jonów Fe(II) na jego właściwości kompleksujące	81
Wykres 47. Wpływ proporcji molowej kwasu elagowego i jonów Fe(II) na jego właściwości kompleksujące	82
Wykres 48. Wpływ proporcji molowej kwasu chlorogenowego i jonów Fe(II) na jego właściwości kompleksujące	83
Wykres 49. Wpływ proporcji molowej kwasu p-kumarowego i jonów Fe(II) na właściwości kompleksujące	84
Wykres 50. Wpływ proporcji molowej kwasu sinapinowego i jonów Fe(II) na jego właściwości kompleksujące	85
Wykres 51. Wpływ proporcji molowej kwasu ferulowego i jonów Fe(II) na jego właściwości kompleksujące	1

ANEKS

Wykres 2A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta\text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie Cp}]$ dla układów zawierających wyłącznie Cp_K lub Cp_M	106
Wykres 3A. Wpływ stężenia Cp_K na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny Cp_K i EPM	107
Wykres 4A. Wpływ stężenia Cp_M na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny Cp_M i EPM	107

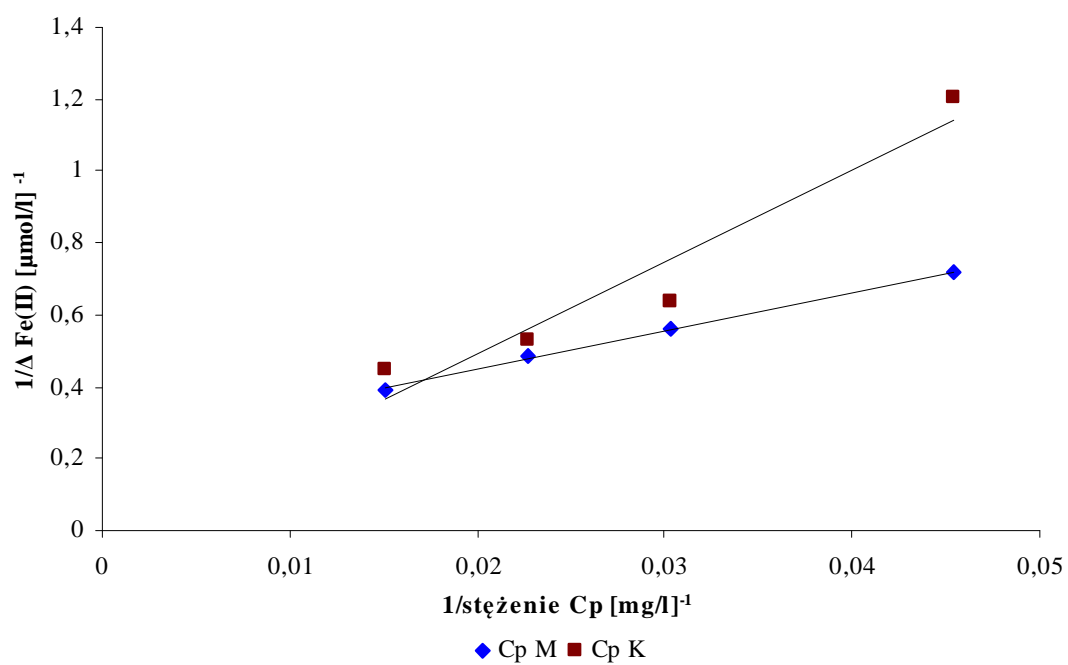
Wykres 7A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta\text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie EPM}]$ dla układów zawierających Cp_K	108
Wykres 8A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta\text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie EPM}]$ dla układów zawierających Cp_M	108
Wykres 9A. Wpływ stężenia Cp_K na zdolność eliminacji Fe(II) mieszaniny Cp_K i kwasu kawowego	109
Wykres 10A. Wpływ stężenia Cp_M na zdolność eliminacji Fe(II) mieszaniny Cp_M i kwasu kawowego	109
Wykres 13A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta\text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu kawowego}]$ dla układów zawierających Cp_K	110
Wykres 14A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta\text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu kawowego}]$ dla układów zawierających Cp_M	110
Wykres 15A. Wpływ stężenia Cp_K na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny Cp_K i kwasu elagowego	111
Wykres 16A. Wpływ stężenia Cp_M na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny Cp_M i kwasu elagowego ...	111
Wykres 19A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta\text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu elagowego}]$ dla układów zawierających Cp_K	112
Wykres 20A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta\text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu elagowego}]$ dla układów zawierających Cp_M	112
Wykres 21A. Wpływ stężenia Cp_K na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny Cp_K i kwasu chlorogenowego	113
Wykres 22A. Wpływ stężenia Cp_M na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny Cp_M i kwasu chlorogenowego	113
Wykres 25A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta\text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu chlorogenowego}]$ dla układów zawierających Cp_K	114
Wykres 26A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta\text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu chlorogenowego}]$ dla układów zawierających Cp_M	114
Wykres 27A. Wpływ stężenia Cp_K na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny Cp_K i kwasu p-kumarowego	115
Wykres 28A. Wpływ stężenia Cp_M na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny Cp_M i kwasu p-kumarowego	115
Wykres 31A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta\text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu p-kumarowego}]$ dla układów zawierających Cp_K	116
Wykres 32A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta\text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu p-kumarowego}]$ dla układów zawierających Cp_M	116
Wykres 33A. Wpływ stężenia Cp_K na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny Cp_K i kwasu sinapinowego	117
Wykres 34A. Wpływ stężenia Cp_M na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny Cp_M i kwasu sinapinowego.	117
Wykres 37A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta\text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu sinapinowego}]$ dla układów zawierających Cp_K	118
Wykres 38A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta\text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu sinapinowego}]$ dla układów zawierających Cp_M	118
Wykres 39A. Wpływ stężenia Cp_K na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny Cp_K i kwasu ferulowego	119

Wykres 40A. Wpływ C_{pM} na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny C_{pM} i kwasu ferulowego119

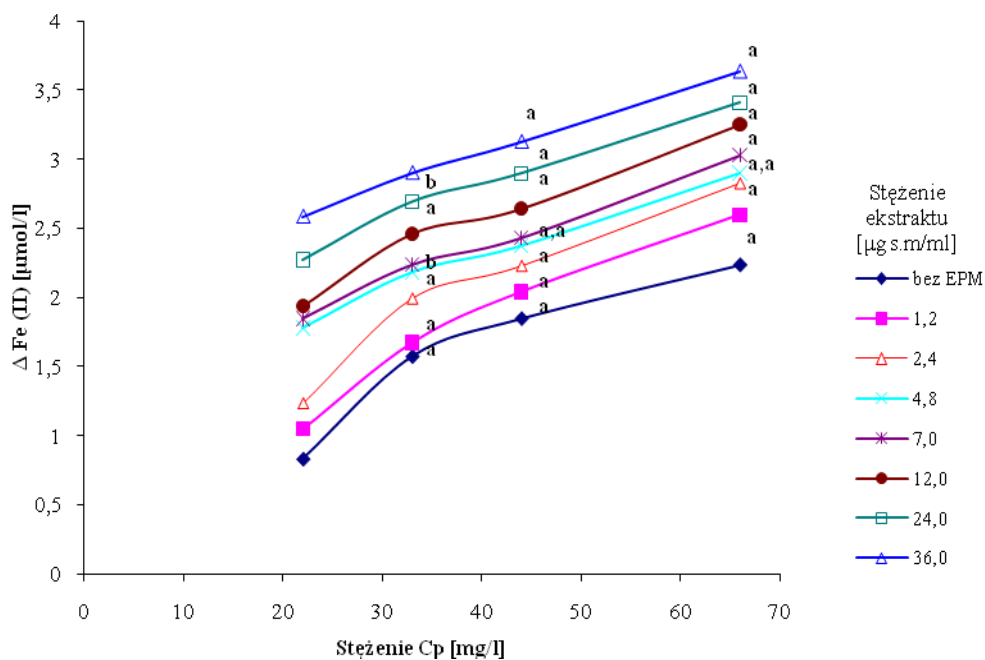
Wykres 43A. Krzywe odwrotności $[1/ \Delta Fe(II)]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu ferulowego}]$
dla układów zawierających C_{pK} 120

Wykres 44A. Krzywe odwrotności $[1/ \Delta Fe(II)]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu ferulowego}]$
dla układów zawierających C_{pM}120

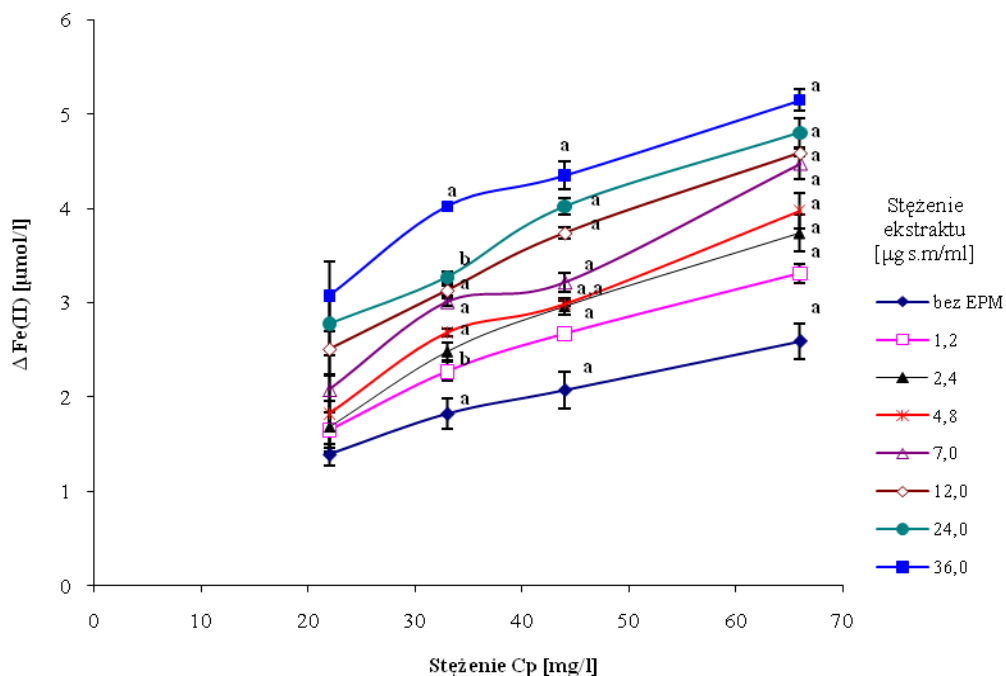
XIV. ANEKS



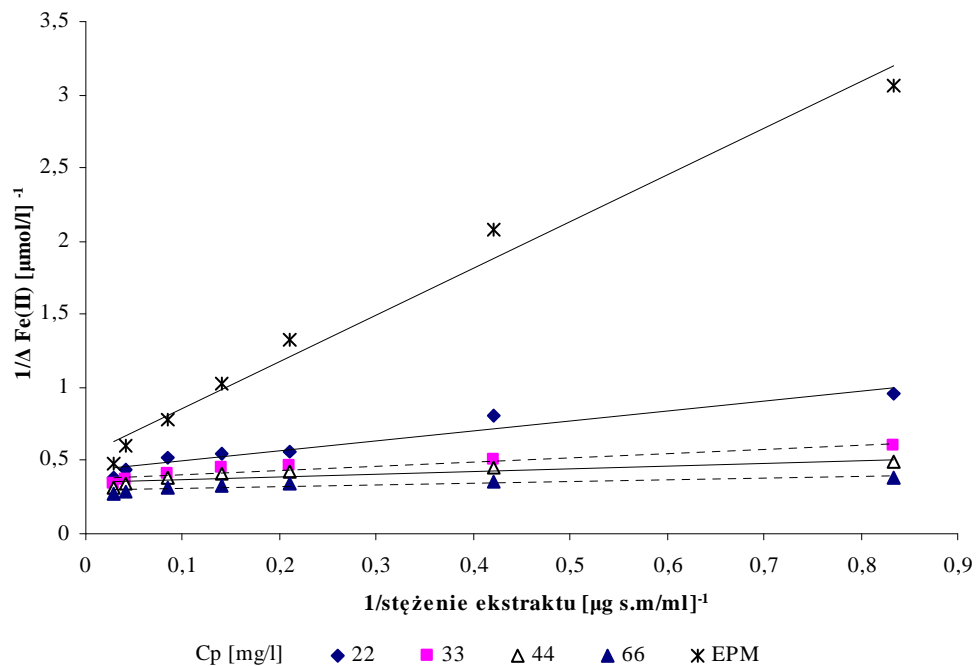
Wykres 2A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta \text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie } C_p]$ dla układów zawierających wyłącznie C_{pK} lub C_{pM} .



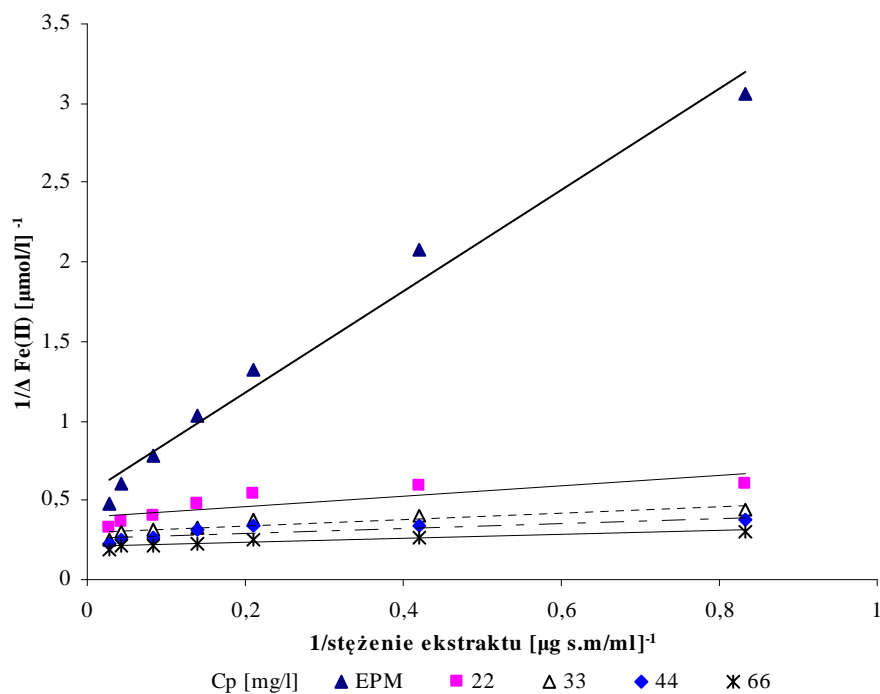
Wykres 3A. Wpływ stężenia C_{pK} na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny C_{pK} i EPM.
różnica istotna statystycznie w porównaniu z najniższym stężeniem C_{pK} lub EPM
a - $p < 0,001$ b - $p < 0,01$



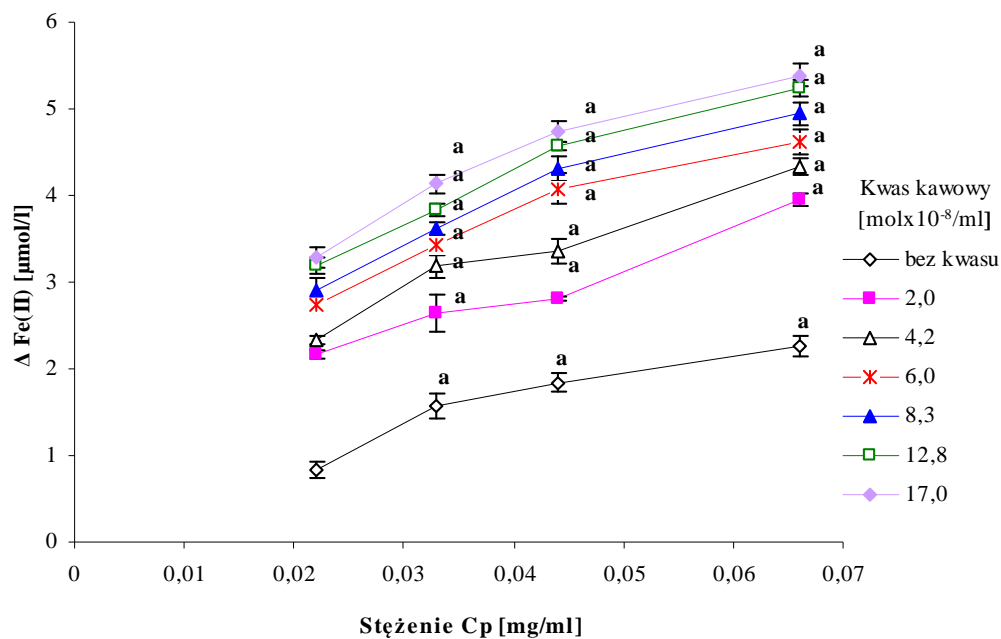
Wykres 4A. Wpływ stężenia C_{pM} na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny C_{pM} i EPM.
różnica istotna statystycznie w porównaniu z najniższym stężeniem C_{pM} lub EPM
a - $p < 0,001$ b - $p < 0,01$



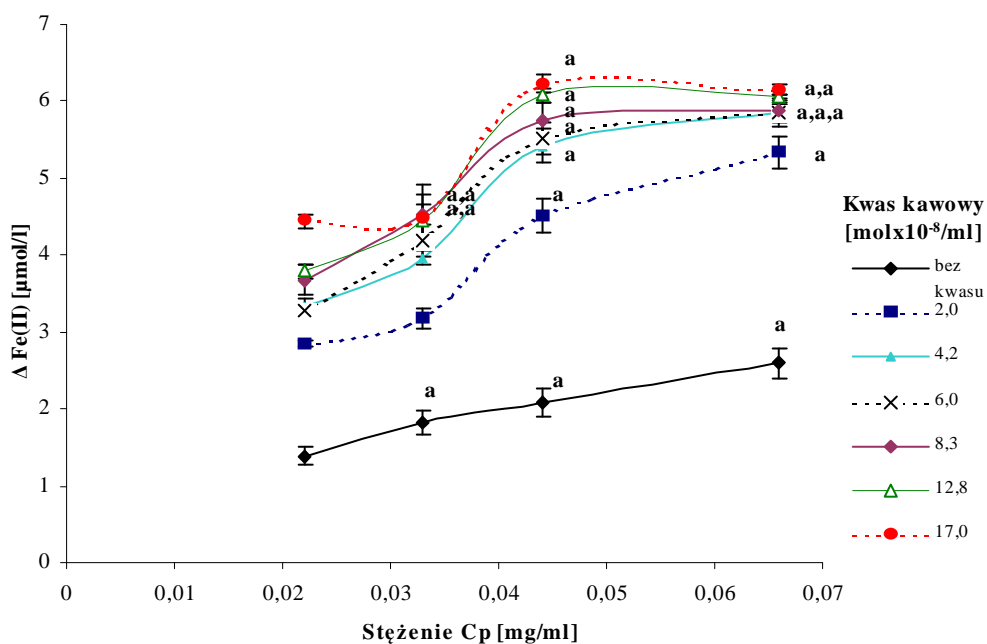
Wykres 7A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta \text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie EPM}]$ dla układów zawierających Cp_K .



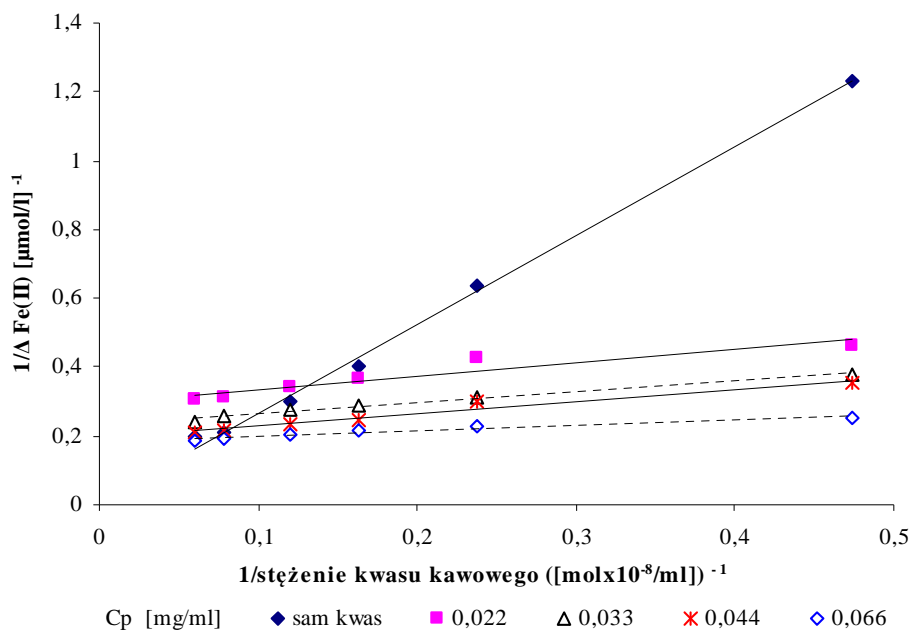
Wykres 8A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta \text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie EPM}]$ dla układów zawierających Cp_M .



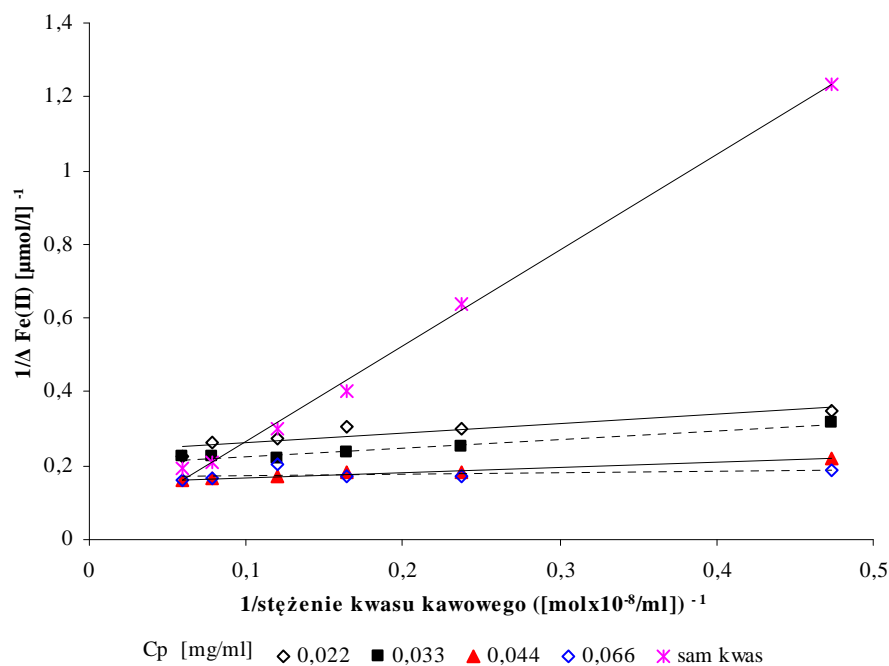
Wykres 9A. Wpływ stężenia C_{pK} na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny C_{pK} i kwasu kawowego.
różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym najniższe stężenie C_{pK} lub kwas
a - $p < 0,001$



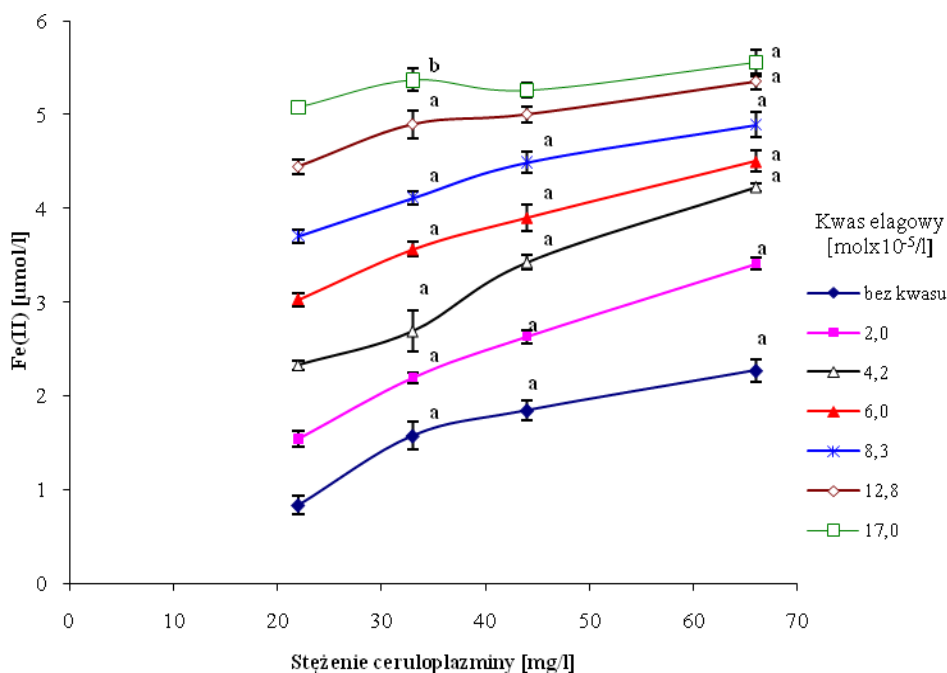
Wykres 10A. Wpływ stężenia C_{pM} na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny C_{pM} i kwasu kawowego.
różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym najniższe stężenie C_{pM} lub kwas
a - $p < 0,001$



Wykres 13A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta Fe(II)]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu kawowego}]$ dla układów zawierających C_{pK} .

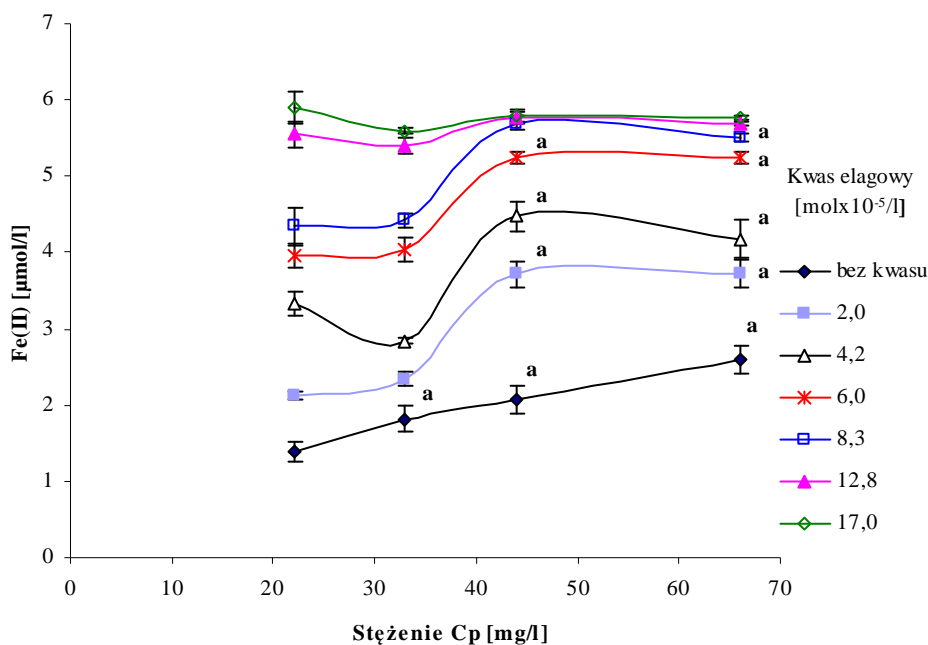


Wykres 14A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta Fe(II)]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu kawowego}]$ dla układów zawierających C_{pM} .



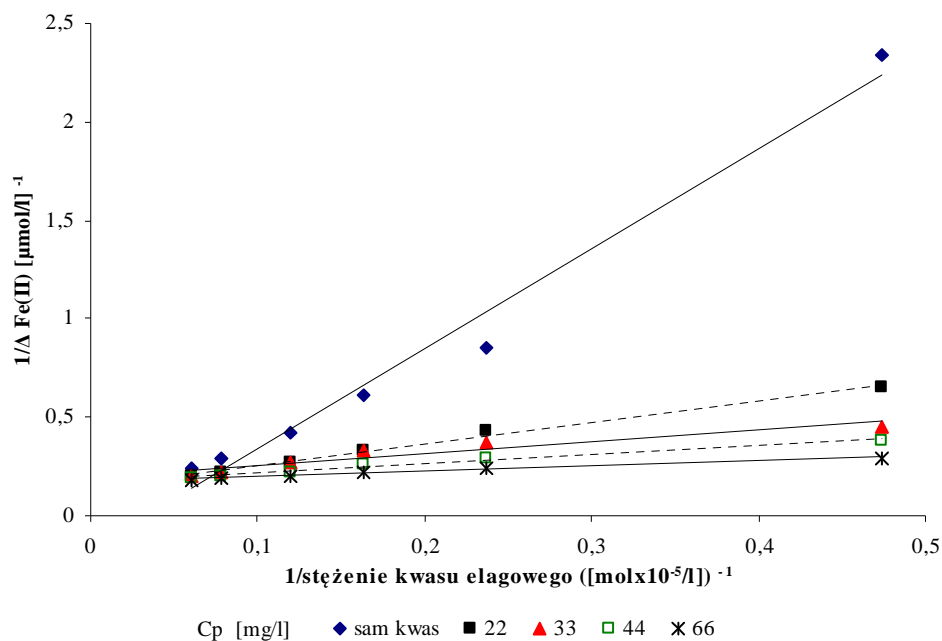
Wykres 15A. Wpływ stężenia C_{pK} na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny C_{pK} i kwasu elagowego.

różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym najniższe stężenie C_{pK} lub kwas
a - $p < 0,001$ **b** - $p < 0,05$

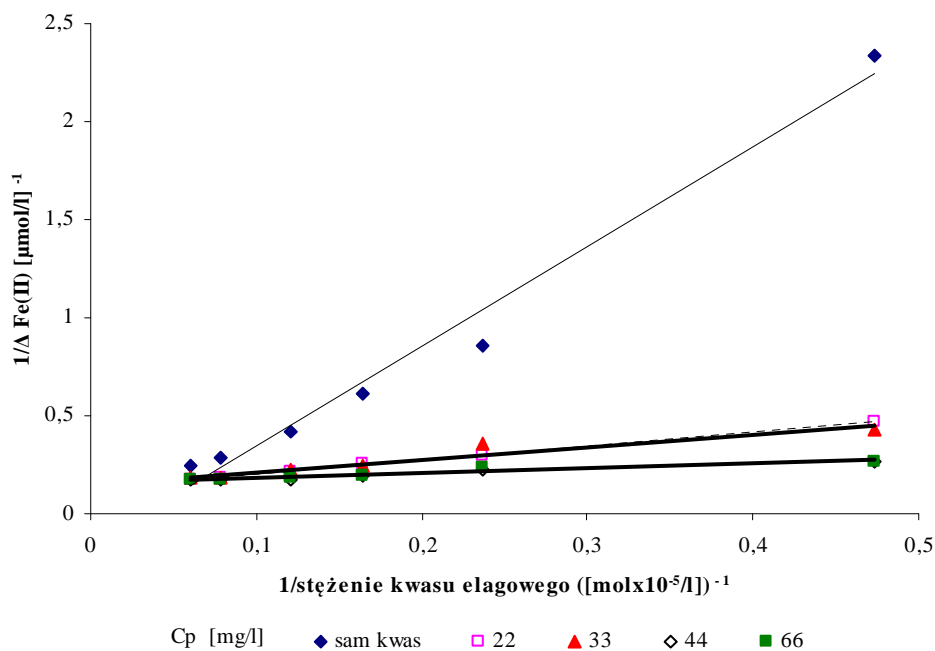


Wykres 16A. Wpływ stężenia C_{pM} na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny C_{pM} i kwasu elagowego.

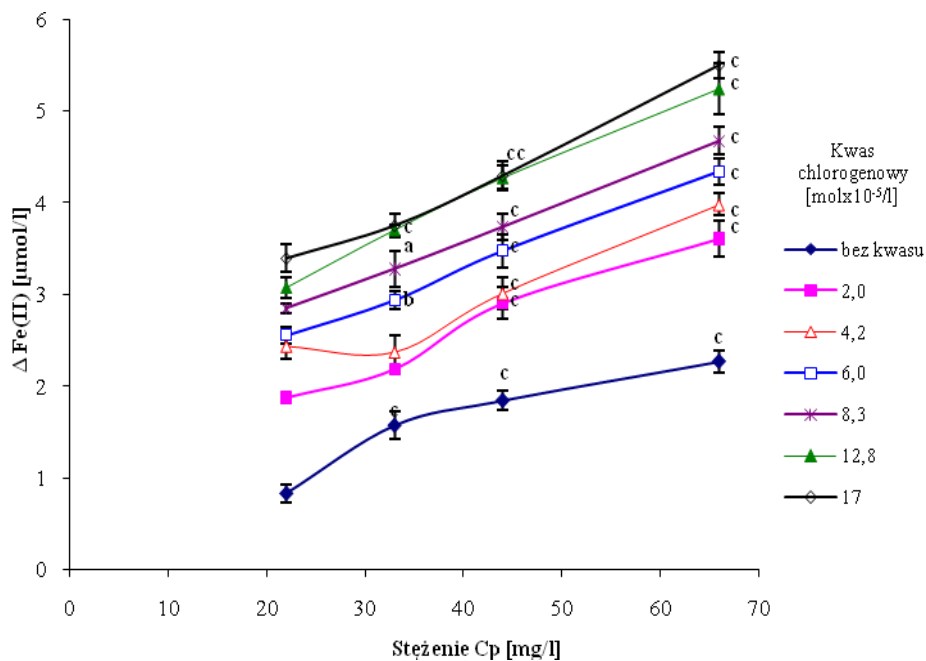
różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym najniższe stężenie C_{pM} lub kwas
a - $p < 0,001$



Wykres 19A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta \text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu elagowego}]$ dla układów zawierających Cp_K .

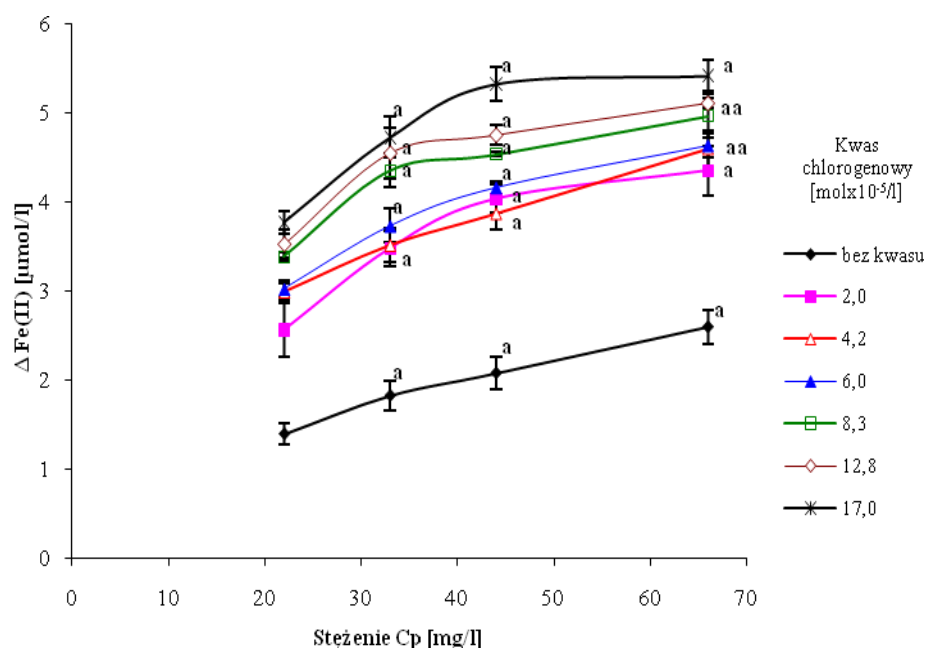


Wykres 20A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta \text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu elagowego}]$ dla układów zawierających Cp_M .



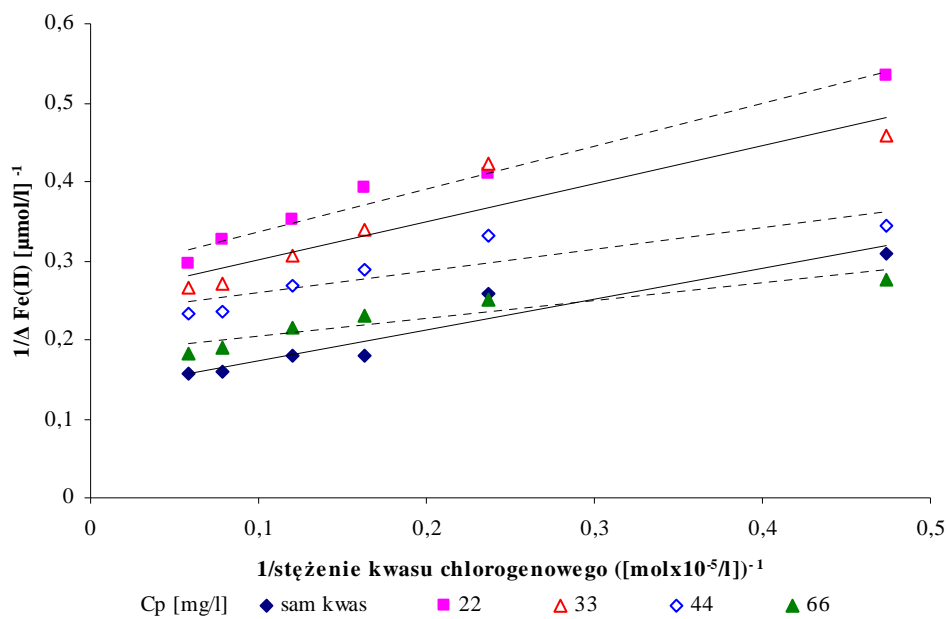
Wykres 21A. Wpływ stężenia C_{pK} eliminacji Fe(II) z mieszaniny C_{pK} i kwasu chlorogenowego.

różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym najniższe stężenie C_{pK} lub kwas
a - $p < 0,01$ **b** - $p < 0,05$ **c** - $p < 0,001$

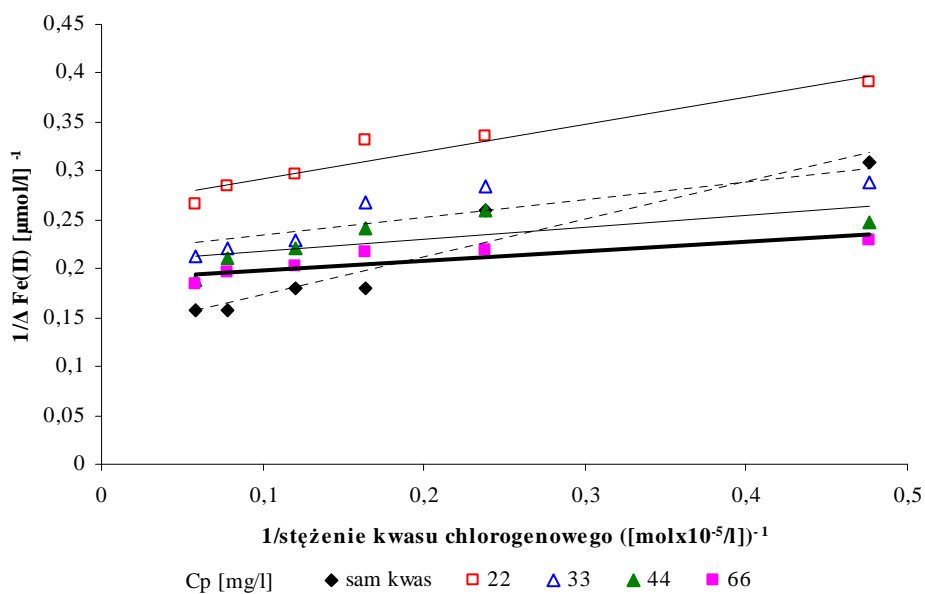


Wykres 22A. Wpływ stężenia C_{pM} na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny C_{pM} i kwasu chlorogenowego.

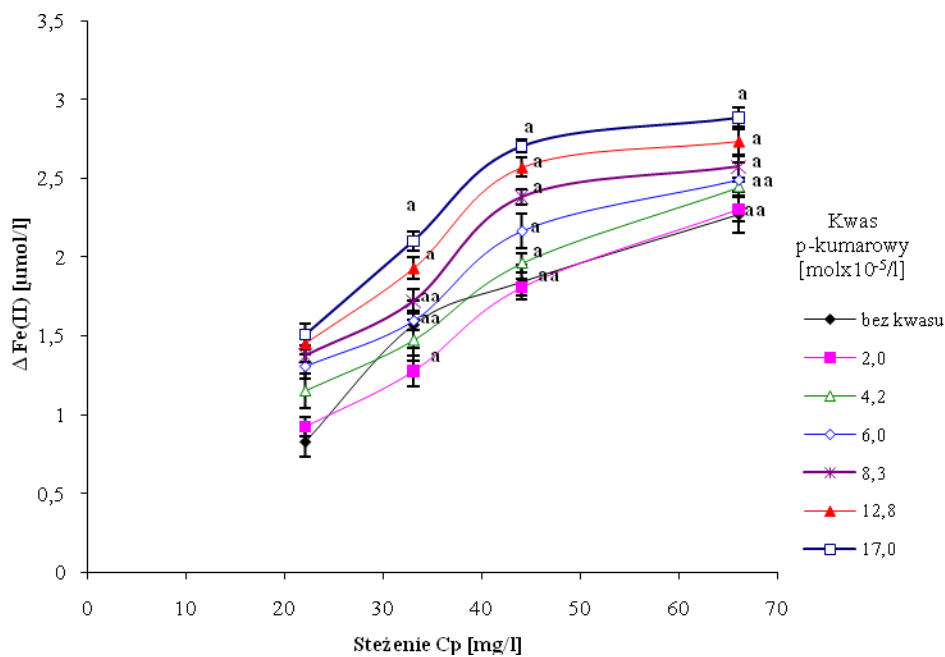
różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym najniższe stężenie C_{pM} lub kwas
a - $p < 0,001$



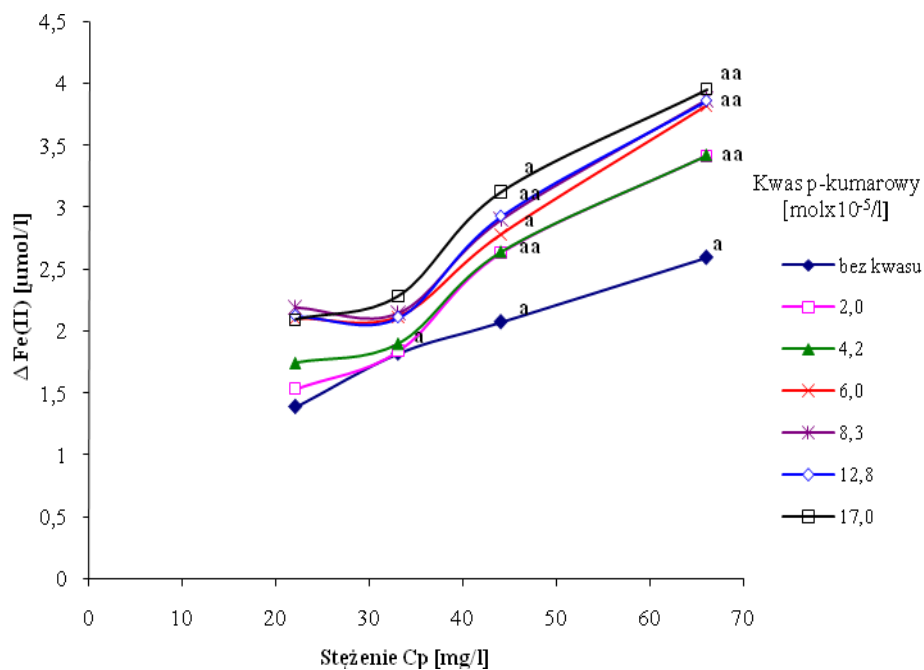
Wykres 25A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta Fe(II)]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu chlorogenowego}]$ dla układów zawierających Cp_K .



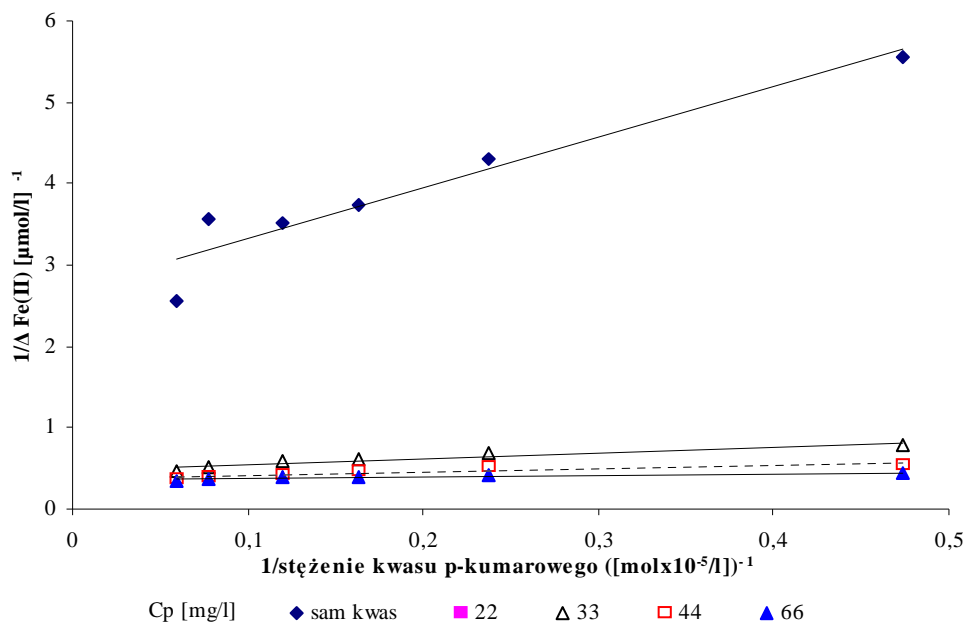
Wykres 26A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta Fe(II)]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu chlorogenowego}]$ dla układów zawierających Cp_M .



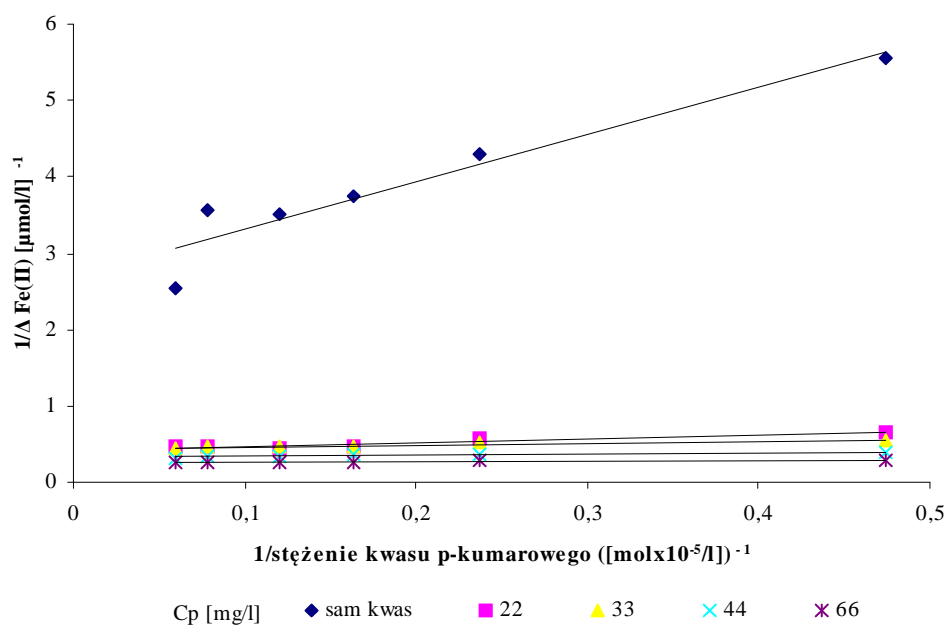
Wykres 27A. Wpływ stężenia C_{pK} na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny C_{pK} i kwasu p-kumarowego.
różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym najniższe stężenie C_{pK} lub kwas
a - $p < 0,001$



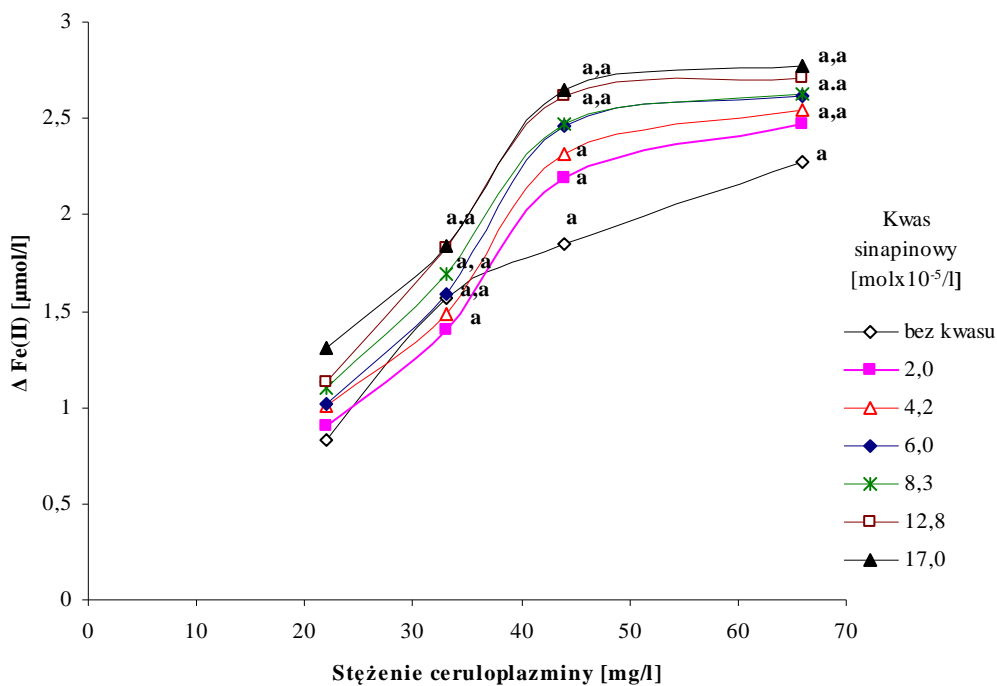
Wykres 28A. Wpływ stężenia C_{pM} na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny C_{pM} i kwasu p-kumarowego.
różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym najniższe stężenie C_{pM} lub kwas
a - $p < 0,001$



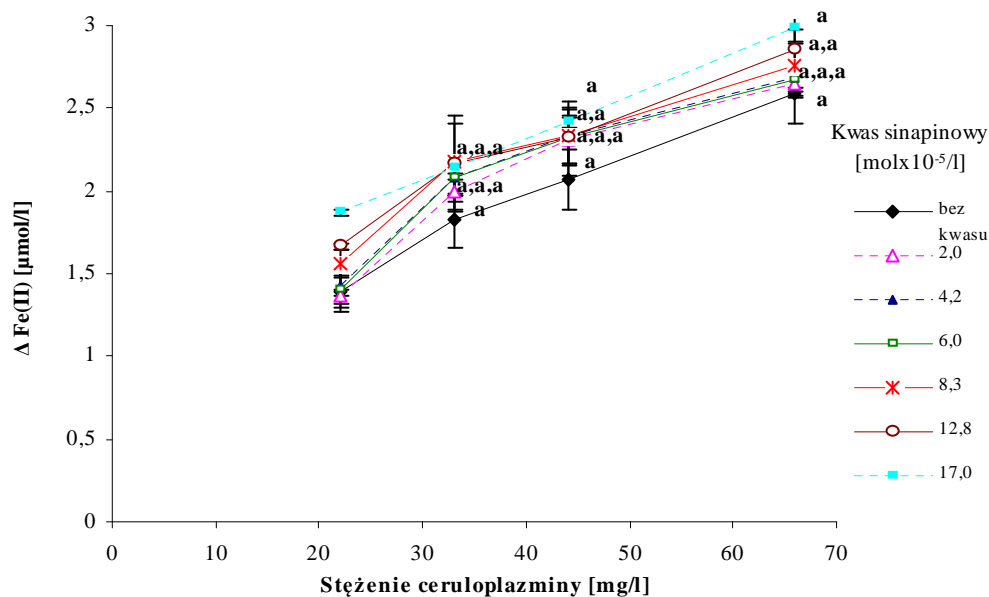
Wykres 31A. Krzywe odwrotności $[1/ \Delta Fe(II)]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu p-kumarowego}]$ dla układów zawierających Cp_K .



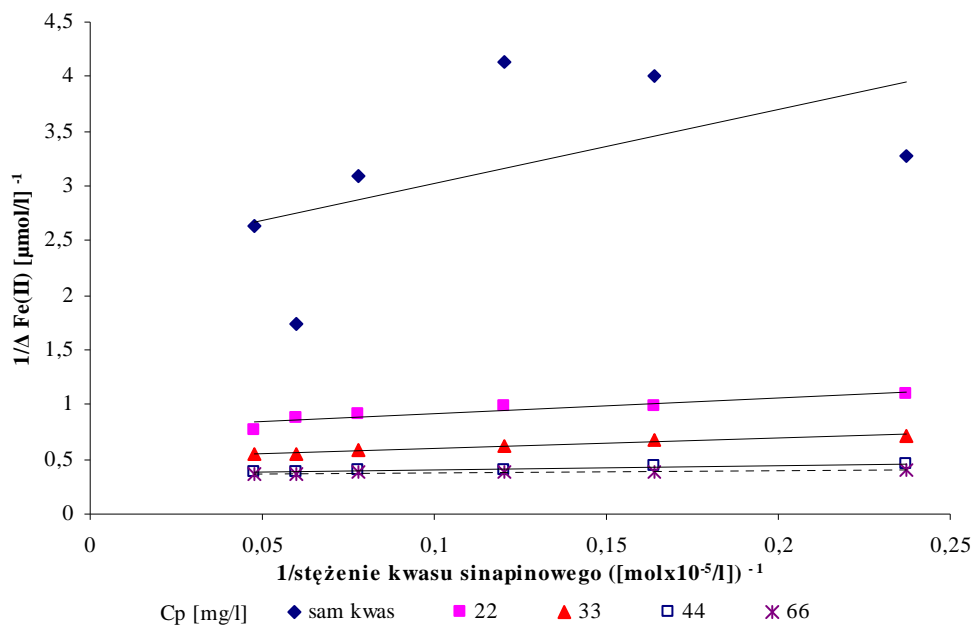
Wykres 32A. Krzywe odwrotności $[1/ \Delta Fe(II)]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu p-kumarowego}]$ dla układów zawierających Cp_M .



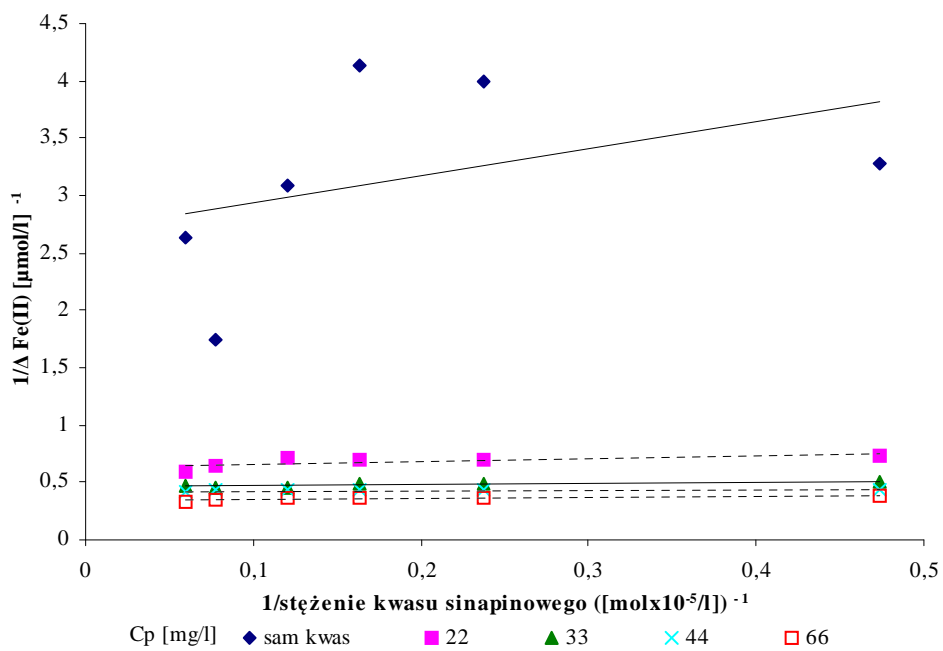
Wykres 33A. Wpływ stężenia Cp_K na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny Cp_K i kwasu sinapinowego.
różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym najniższe stężenie Cp_K lub kwas
a - $p < 0,001$



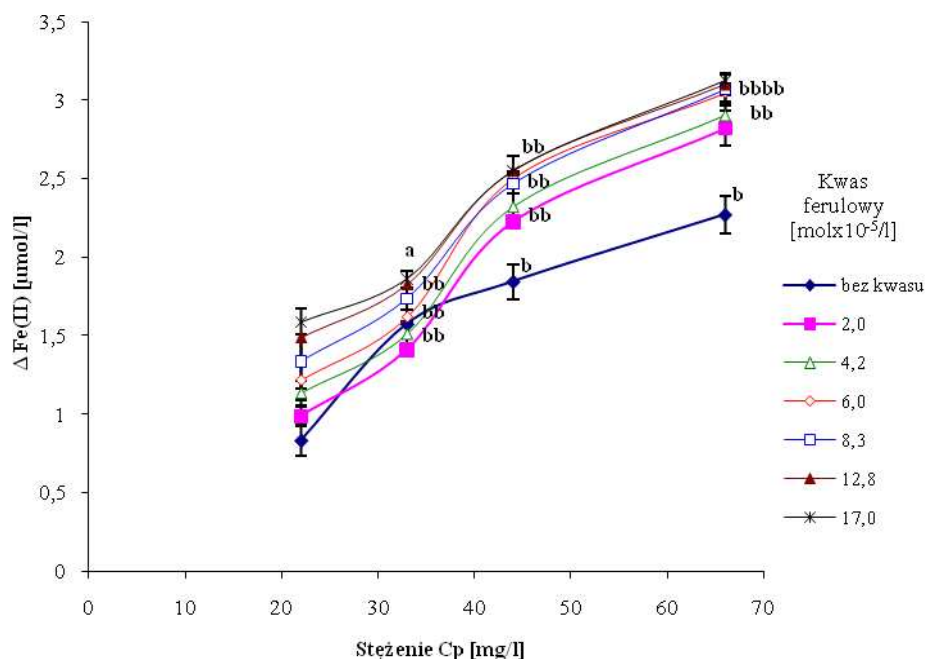
Wykres 34A. Wpływ stężenia Cp_M na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny Cp_M i kwasu sinapinowego.
różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym najniższe stężenie Cp_M lub kwas
a - $p < 0,001$



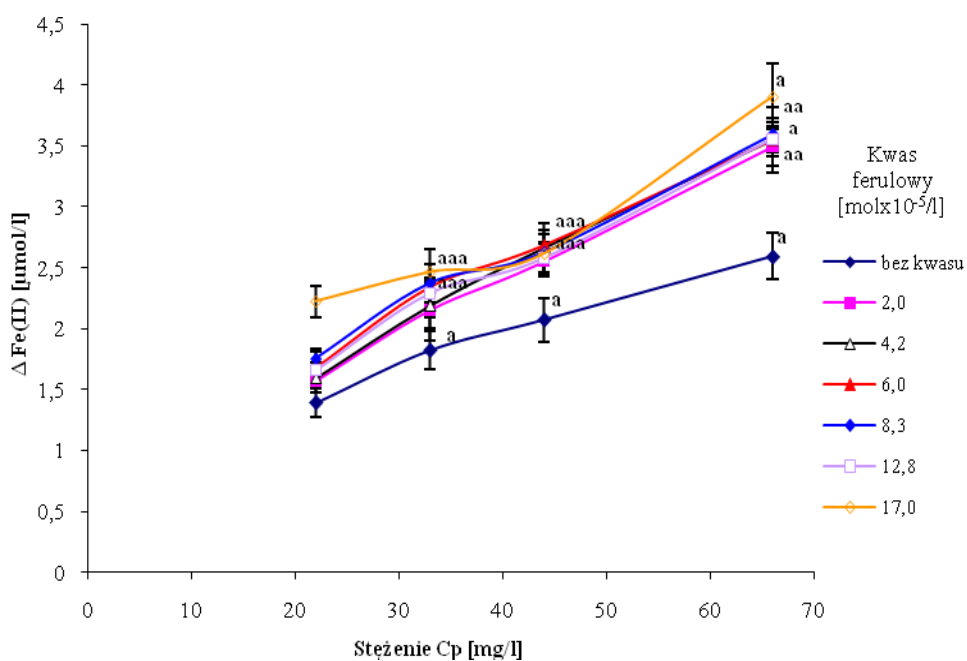
Wykres 37A. Krzywe odwrotności $[1/ \Delta\text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu sinapinowego}]$ dla układów zawierających Cp_K .



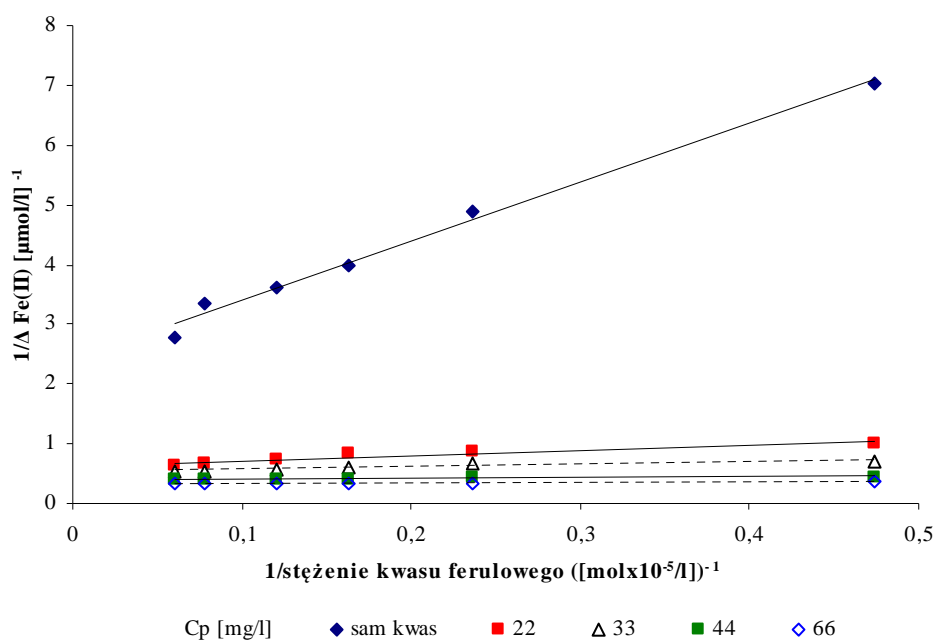
Wykres 38A. Krzywe odwrotności $[1/ \Delta\text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu sinapinowego}]$ dla układów zawierających Cp_M .



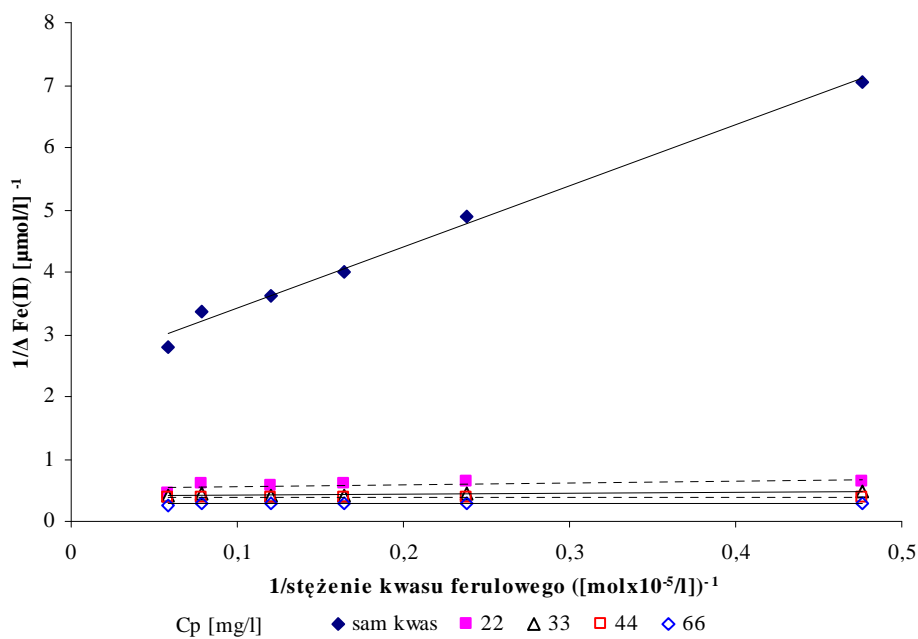
Wykres 39A. Wpływ stężenia C_{pK} na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny C_{pK} i kwasu ferulowego.
różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym najniższe stężenie C_{pK} lub kwas
a - $p < 0,05$ **b** - $p < 0,001$



Wykres 40A. Wpływ stężenia C_{pM} na zdolność eliminacji Fe(II) z mieszaniny C_{pM} i kwasu ferulowego.
różnica istotna statystycznie w porównaniu z układem zawierającym najniższe stężenie C_{pM}
a - $p < 0,001$



Wykres 43A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta \text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu ferulowego}]$ dla układów zawierających C_{pK} .



Wykres 44A. Krzywe odwrotności $[1/\Delta \text{Fe(II)}]$ vs $[1/\text{stężenie kwasu ferulowego}]$ dla układów zawierających C_{pM} .

XV. PIŚMIENICTWO

- [1]. Mrózek-Ryszawa N., Kawczyńska-Drózdź A., Biernacka B., *et al.*: Roślinne polifenole-przeciwutleniacze na które czekamy? *Czynniki Ryzyka*, 2008, 2, 73-87.
- [2]. Keys A.: Coronary heart disease in seven countries. *Circulation*, 1970, 41.
- [3]. St. Leger A.S., Cochrane A.L., Moore F.: Factors associated with cardiomortality in developer countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*, 1979, 1017-1023.
- [4]. Renaud S., de Lorgeril M., Delaye J., *et al.*: Cretan mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am J Din Nutr.* 1995, 61, 1360S-7S.
- [5]. Ignatowicz E., Baer-Dubowska W.: Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. *Pol J Pharmacol.* 2001, 53, 557-569.
- [6]. Olas B., Wachowicz B.: Resveratrol , a phenolic antioxidant with effects on blond platelet function. *Platelets*, 2005, 26, 251-260.
- [7]. Frankel E.N., Kanner J., German J.B., *et al.*: Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substanses in red wine. *Lancet*, 1993, 341, 454-457.
- [8]. van Acker S.A.B.E., van Der Berg D.J., Tromp M.N.J.L., *et al.*: Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med.* 1996, 20, 331-342.
- [9]. Bors W., Heller W., Michel C., Saran M.: Radical chemistry of flavonoid antioxidants. *Antioxidants in therapy and preventive medicine.* New York: Plenum Press. 1990, 165-170.
- [10]. Bors W., Heller W., Michel C., Saran M.: Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 1990, 186, 343-354.
- [11]. Husain S.R., Cillard J., Cillard P.: Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 1987, 26, 2489-2491.
- [12]. Cotellet, N.; Bernier, J.L.; Henichart, J.P.; Catteau, J.P.; Gaydou, E.; Wallet, J.C.: Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. *Free Radic Biol Med.* 1992, 13, 211-219.
- [13]. Sichel G., Corsaro C., Scalia M., *et al.*: In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂. *Free Radic Biol Med.* 1991, 11, 1-8.
- [14]. Hodnick W.F., Milosavljevic E.B., Nelson J.H., Pardini R.S.: Electrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. *Biochem Pharmacol.* 1988, 37, 2607-2611.

- [15]. Cholbi M.R., Paya M., Alcaraz M.J.: Inhibitory effect of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia*. 1991, 47, 195-199.
- [16]. Mora A., Paya M., Rios J.L. *et al.*: Structure – activity relationship of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol*. 1990, 40, 793-797.
- [17]. „Przeciwutleniacze w żywności”, praca zbiorowa pod redakcją Włodzimierza Grajka, rozdział 6, 331-390, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2007.
- [18]. Day, A.J.; Gee, J.M.; *et al.*: Adsorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4' glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium dependent glucose transporter. *Biochem Pharmacol*. 2003, 65, 1199-1206.
- [19]. Hollman, P.C.H.; de Vries, J.H.M.; *et al.*: Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*. 1995, 62, 1276-1282.
- [20]. Piskula, M.K.; Terao, J.: Quercetin's solubility affects its accumulation in rat plasma after oral administration. *J Agric Food Chem*. 1998, 46, 4313-4317.
- [21]. Walle, T.; Browning, A.M.; *et al.*: Flavonoid glucosides are hydrolysed thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr*. 2005, 135, 48-52.
- [22]. Murota, K.; Terao, J.: Quercetin appears in the lymph of unanesthetized rats as its phase II metabolites after administered into the stomach. *FEBS Lett*. 2005, 579, 5343-5346.
- [23]. Maubach, J.; Bracke, M.E.; *et al.*: Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high performance liquid chromatography. *J Chrom B*. 2003, 784, 137-144.
- [24]. Hong, S.J.; Kim, S.M.; *et al.*: Comparative study of concentration of isoflavones and lignans in plasma and prostatic tissues of normal control and benign prostatic hyperplasia. *Yonsei Med J*. 2002, 43(2), 236-241.
- [25]. Holt, R.R.; Lazarus, S.A. *et al.*: Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4-β-80 epicatechin in humans plasma after the consumption of a flavonol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr*. 2002, 76, 798-804.
- [26]. Gonthier, M.P.; Donovan J.L.; *et al.*: Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic Biol Med*. 2003, 35, 837-844.
- [27]. Chow, H.H.; Hakim, I.A.; Vining, D.R.; *et al.*: Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res*. 2005, 11, 4627-4633.

- [28]. Manach C., Scalbert A., Monard C., *et al.*: Polyphenols : Food sources and bio-availability. *Am J Clin Nutr.* 2004, 79(5), 727-747.
- [29]. Hippeli S., Elstner E.F.: Transition metal ion-catalyzed oxygen activation during pathogenic processes. *FEBS Lett.* 1999, 443(1), 1-7.
- [30]. Welch K.D., Davis T.Z., Aust S.D.: Iron autoxidation and free radical generation: effect of buffers, ligands, and chelators. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 397(2), 360-369.
- [31]. Yang X., Chasteen N.D.: Ferroxidase activity of ferritin: effects of pH, buffer and Fe(II) and Fe(III) concentration on Fe(II) autoxidation and ferroxidation. *Biochem J.* 1999, 338(3), 615-618.
- [32]. Chvátalová K., Slaninová I., Březinová L., Slanina J.: Influence of dietary phenolic acids on redox status of iron: ferrous iron autoxidation and ferric iron reduction. *Food Chemistry*, 2008, 106, 650-660.
- [33]. Moridani M.Y., Pourahmad J., Bui H., *et al.*: Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radic Biol Med.* 2003, 34(2), 243-253.
- [34]. Zhao, Z. S.; Khan, S.; O'Brien, P. J.: Catecholic iron complexes as cytoprotective superoxide scavengers against hypoxia: reoxygenation injury in isolated hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 56: 825–830; 1998.
- [35]. Park K.H., Park Y., Han J., *et al.*: Anti-atherosclerotic and anti-inflammatory activities of catecholic xanthenes and flavonoids isolated from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006, 16, 5580–5583.
- [36]. Salah N., Miller N.J., Pagsngs G., *et al.*: Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and chain – breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys.* 1995, 322, 339-546
- [37]. Cao G., Sofic E., Prior R. L.: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationship”, *Free Radic Biol Med.* 1997, 22, 749-760.
- [38]. Yamanaka N., Oda O., Nagao S.: Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu⁺² –induced low density lipoprotein oxidation. *FEBS Lett.* 1997, 405, 186-190.
- [39]. Sahu S. C., Washington M. C.: Quercetin-induced lipid peroxidation and DNA damage in isolated rat-liver nuclei. *Cancer Lett.* 1991, 58, 75-79.
- [40]. Said Ahmed M., Fazal F., Rahman A., *et al.*: Activities of flavonoids for the cleavage of DNA in the presence of Cu(II): correlation with generation of active oxygen species. *Carcinogenesis*, 1992, 13, 605-608.

- [41]. Yoshino M., Haneda M., Naruse M., *et al.*: Prooxidant activity of flavonoids: copper dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab.* 1999, 68, 468-472.
- [42]. Hodnick W.F., Ahmad S., Pardini R.S.: Induction of oxidative stress by redox active flavonoids. *Adv Exp Med Biol.* 1998, 439, 131-150.
- [43]. Galati G., Sabzevari O., Wilson J. X., *et al.*: Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics", *Toxicology*, 2002, 177, 91-104.
- [44]. Elliger C.A., Henika P.R., MacGregor J.T.: Mutagenicity of flavones, chromones and acetophenones in *Salmonella typhimurium*. New structure-activity relationship. *Mutat Res* 1984, 135, 77-86.
- [45]. Zhu B.T., Liehr J.G.: Quercetin increases the severity of estradiol-induced tumorigenesis in hamster kidney. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994, 125, 149-158.
- [46]. Nagao M., Morita N., Yahagi T., Sugimura T.: Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environ. Mutagenesis*, 1981, 3, 401-419.
- [47]. Sahu S.C., Gray G.C.: Kaempferol – induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Lett.* 1994, 85, 159-164.
- [48]. Sahu S.C., Gray G.C.: Interactions of flavonoids and trace metals: myricetin – induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Lett.* 1993, 70, 73-79.
- [49]. Sahu S.C., Gray G.C.: Pro-oxidant activity of flavonoids: effects of glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett.* 1996, 104, 193-196.
- [50]. Chan T., Galati G., O'Brien P.J.: Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones or flavanones. *Chem Biol Interact*, 1999, 122, 15-25.
- [51]. Ohshima H., Yoshie Y., Auriol S., Gilbert I.: Antioxidant and prooxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radic Biol Med.* 1998, 25, 1057-1065.
- [52]. Siquet C., Pavia-Martins F., Lima J. F.L.C., *et al.*: Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acid – a structure – activity relationship study. *Free Radic Res.* 2006, 40(4), 433-442.
- [53]. Cuvelier M.E., Richard H., Berset C.: Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure – activity relationship. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1992, 56(2), 324-325.
- [54]. Chen J.H., Ho C.-T.: Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J Agric Food Chem.* 1997, 45(7), 2374-2378.

- [55]. Medina I., Gallardo J.M., Gonzalez M.J., *et al.*: Effect of molecular structure of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. *J Agric Food Chem.* 2007, 55(10), 3889-3895.
- [56]. Sroka Z., Cisowski W.: Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol.*, 2003, 41(6), 753-758.
- [57]. Cheng J.-C., Dai F., Zhou B., *et al.*: Antioxidant activity of hydrocinnamic acid derivative in human low density lipoprotein: mechanism and structure-activity relationship. *Food Chemistry*, 2007, 104(1), 132-139.
- [58]. Marinova E.M., Toneva A., Yanishlieva N.: Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. *Food Chemistry*, 2009, 114, 1498-1502.
- [59]. Clifford M.N.: Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 1999, 79, 362.
- [60]. Olthof M.R., Hollman P.C., Katan M.B.: Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr.* 2001, 131, 66.
- [61]. Gugliucci A., Markowicz Bastos D.H.: Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. *Fitoterapia*, 2009, 80, 138-142.
- [62]. Han X., Shen T., Lou H.: Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci.* 2007, 8, 950-988.
- [63]. Bruno R.S., Leonard S.W., Atkinson J., *et al.*: Faster plasma vitamin E disappearance in smokers is normalized by vitamin C supplementation. *Free Radic Biol Med.* 2006, 40, 689-697.
- [64]. Barceloux D.G.: Selenium, *J Toxicol Clin Toxicol.* 1999, 37, 145-172.
- [65]. Surai P.F.: Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. UK. Nottingham University, 2003.
- [66]. Peters U., Foster C.B., Chatterjee N., *et al.*: Serum selenium and risk of prostate cancer - a nested case-control study. *Am J Clin Nutr.* 2007, 85, 209-217.
- [67]. Miller E.R.III, Pastor -Barriuso R., Dallal D., *et al.*: Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med.* 2005, 142, (1), 37-46.
- [68]. Lonn E., Bosch J., Yusuf S., *et al.*: Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2005, 293, 1338-1347.

- [69]. Iskra M., Majewski W.: Aktywność wybranych enzymów miedziozależnych oraz stężenia miedzi w ścianie tętniczej i surowicy krwi w miażdżycy tętnic i tętniakach aorty. *Biul Magnezol.* 2001, 6(4), 536-541.
- [70]. Shen S.Q., Zhang Y., Xiang J.J., *et al.*: Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. *World J Gastroenterol.* 2007, 13, 1953-1961.
- [71]. Nishinaka T., Ichijo Y., Ito M., *et al.*: Curcumin activates human glutathione S-transferase P1 expression through antioxidant response element. *Toxicol Lett.* 2007, 170, 238-247.
- [72]. Molina M.F., Sanchez-Reus I., Iglesias I., *et al.*: Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol Pharm Bull.* 2003, 26, 1398-1402.
- [73]. Fki I., Sahnoun Z., Sayadi S.: Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. *J Agric Food Chem.* 2007, 55(3), 624-631.
- [74]. Fox P.L., Mazumder B., Ehrenwald E., *et al.*: Ceruloplasmin and cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2000, 28, 1735-1744.
- [75]. Holmberg G.C., Laurell C.B.: Investigation serum copper. Part II: isolation of the copper containing protein, and a description of some of its properties. *Acta Chem Scand.* 1948, (2), 550-556.
- [76]. Shukla N., Maher J., Masters J., *et al.*: Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor? *Atherosclerosis*, 2006, 238-250.
- [77]. Majewski W., Iskra M., Stanišić M., *et al.*: The importance of ceruloplasmin oxidase activity in patients with chronic lower limb atherosclerotic ischemia. *Int Angiol.* 2007, 26 (4), 341-345.
- [78]. Iskra M., Majewski W.: Oxidase activity of ceruloplasmin and concentrations of copper and zinc in serum in chronic arterial occlusion of the lower limbs. *J Trace Elements Med Biol.* 1999, 13, 76-81.
- [79]. Bielli P., Calabrese L.: Structure to function relationship in ceruloplasmin: a 'moon-lighting' protein. *Cell Mol Life Sci.* 2002, 59, 1413-1427.
- [80]. Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E.: Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev.* 1996, 96, 2563-2605.
- [81]. Noyer M., Dwulet F.E., Hao Y.L., Putnam F.W.: Purification and characterization of undergraded human ceruloplasmin. *Anal Biochem.* 1980, 102, 450-458.

- [82]. Malmstrom B.G., Reinhammar B., Vanngard T.: Two forms of copper (II) in fungal laccase. *Biochim Biophys Acta*. 1968, 156, 67-76.
- [83]. Gunnarson P.O., Nylén U., Pettersson G.: Effect of pH on electron-paramagnetic-resonance spectra of ceruloplasmin. *Eur J Biochem*. 1973, 37, 47-50.
- [84]. Manabe T., Hatano H., Hiromi K.: Kinetic studies on the aerobic oxidation of reduced human ceruloplasmin. *J Biochem*. 1973, 73, 1169-1174.
- [85]. Musci G., Bonaccorsi di Pati M.C., Calabrese L.: The state of the copper sites in human ceruloplasmin. *Arch Biochem Biophys*. 1993, 306, 111-118.
- [86]. Reinhammar B.R.M.: Oxidation-reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin. *Biochim Biophys Acta*. 1972, 275, 245-259.
- [87]. Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D.: Trace elements and pathology: copper. *Biomed Pharmacother*. 2003, 57, 386-398.
- [88]. Phoraska J.R., Gybina A.A.: Intracellular copper transport in mammals. *J Nutr*. 2004, 134, 1003-1006.
- [89]. Frieden E., Hsieh H.S.: Ceruloplasmin: the copper transport protein with essential oxidase activity. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1976, 44, 187-236.
- [90]. Harris Z.L.: Aceruloplasminemia. *Neurol Sci*. 2003, 207, 108-109.
- [91]. Meyer L.A., Durley A.P., Prohaska J.R. et al.: Copper transport and metabolism are normal in acaeruloplasminaemic mice. *J Biol Chem*. 2001, 276, 36857-36861.
- [92]. Gutteridge J.M.C.: Antioxidant properties of ceruloplasmin towards iron- and copper-dependent oxygen radical formation. *FEBS Lett*. 1983, 157, 37-40.
- [93]. Gutteridge J.M.C.: Inhibition of the Fenton reaction by the protein ceruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities. *Chem Biol Interact*. 1985, 56, 113-120.
- [94]. Engström G., Lind P., Hedblad B., et al.: The effects of cholesterol and inflammation-sensitive proteins on incidence of stroke and myocardial infarction. *Circulation*, 2002, 105, 2632-2637.
- [95]. Engström G., Lind P., Hedblad B., et al.: Inflammation-sensitive plasma proteins, diabetes, and mortality and incidence of myocardial infarction and stroke. *Diabetes*, 2003, 52, 442-447.
- [96]. Hansson G.K.: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005, 352, 1685-1695.
- [97]. Manttari M., Manninen V., Huttunen J.K. et al.: Serum ferritin and caeruloplasmin as coronary risk factors. *Eur Heart J*. 1994, 15, 1599-1603.

- [98]. Salonen J.T., Salonen R., Korpela H., *et al.*: Serum copper and the risk of acute myocardial infarction: a prospective study in men in Eastern Finland. *Am J Epidemiol.* 1991, 134, 268-76.
- [99]. Ferns G.A.A., Lamb D.J., Taylor A.: The possible role of copper ions in atherogenesis: The Blue Janus. *Atherosclerosis*, 1997, 133, 139-152.
- [100]. Jeremy J.Y. Yim A.P., Wan S., Angelini G.D.: Oxidative stress, nitric oxide and vascular disease. *Cardiovasc Surg.* 2002, 17, 324-327.
- [101]. Koppenol W.H.: The Haber-Weiss cycle-70 years on. *Redox Rep.* 2001, 6, 229-234.
- [102]. Gutteridge J.M.: Copper-phenanthroline-induced site-specific oxygen-radical damage to DNA: detection of loosely bound trace copper in biological fluids. *Biochem J.* 1984, 218, 983-985.
- [103]. Musci G., Fraterrigo T.Z.L., Calabrese L., McMillin D.R.: On the lability and functional significance of the type I copper pool in ceruloplasmin. *JBIC*, 1999, 4, 441-446.
- [104]. Choi S.Y., Kwon H.Y., Kwon O.B., *et al.*: Fragmentation of human ceruloplasmin induced by hydrogen peroxide. *Biochimie*, 2000, 82, 175-180.
- [105]. Swain J.A., Darley-Usmar V., Gutteridge J.M.: Peroxynitrite releases copper from ceruloplasmin: implications for atherosclerosis. *FEBS Lett.* 1994, 342, 49-52.
- [106]. Kang J.H., Kim K.S., Choi S.Y., *et al.*: Oxidative modification of human ceruloplasmin by peroxy radicals. *Biochim Biophys Acta.* 2001, 1568, 30-36.
- [107]. Swain J., Gutteridge J.M.C.: Prooxidant iron and copper, with ferroxidase xanthine oxidase activities in human atherosclerotic material. *FEBS Lett.* 1995, 368, 513-515.
- [108]. Singleton V.L., Rossi J.A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticul.* 1965, 16, 144-158.
- [109]. Johnson D.A., Osaki S., Frieden E.: A micromethod for the determination of ferroxidase (ceruloplasmin) in human serums. *Clin Chem.* 1967, 13, 142-150.
- [110]. Gryszczyńska B., Iskra M., Małecka M., Wielkoszyński T.: Raspberry seed extract effect on the ferroxidase activity of ceruloplasmin. *Food Chemistry*, 2009, 112, 695-701.
- [111]. Andjelković M., van Camp J., De Meulenaer B., *et al.*: Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*, 2006, 98, 23-31.
- [112]. Belay A., Gholap A.V.: Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. *Afr J Pure Appl Chem.* 2009, 3(11), 234-240.

- [113]. Cornard J., Caudron A., Merlin J.: UV-visible and synchronous fluorescence spectroscopic investigations of the complexation of Al(III) with caffeic acid, in aqueous low acidic medium. *Polyhedron*, 2006, 25, 2215-2222.
- [114]. Moridani M.Y., O'Brien P.J.: Iron complexes of deferiprone and dietary plant catechols as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Bioch Pharmacol.* 2001, 62, 1579-1585.
- [115]. Fernandez M.T., Mira M. L., Florencio H. M., Jennings K.R.: Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J Inorg Biochem.* 2002, 92, 105-111.
- [116]. Hynes M.J., O'Coinceanainn M.: The kinetics and mechanisms of reaction of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *J Inorg Biochem.* 2004, 98, 1457-1464.
- [117]. Kawabata T., Schepkin V., Haramaki N., *et al.*: Iron coordination by catechol derivative antioxidants. *Bioch Pharmacol.* 1996, 51, 1569-1577.
- [118]. Krishna C.M., Liebmann J.E., Kaufman D., *et al.*: The catecholic metal sequestering agent 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate confers protection against oxidative cell damage. *Arch Biochem Biophys.* 1992, 294, 98-106.
- [119]. Kono Y., Kashine S., Yoneyama T., *et al.*: Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998, 62(1), 22-27.