

Spis treści

SKRÓTY I SYMBOLE STOSOWANE W PRACY	4
1 STRESZCZENIE	11
2 WSTĘP	15
2.1 Błona biologiczna.....	15
2.1.1 Ogólna charakterystyka lipidów występujących w błonach.....	15
2.1.2 Przemiany fazowe lipidów	17
2.1.3 Ruchliwość dwuwarstwy lipidowej.....	18
2.1.4 Agregacja związków amfifilowych.....	19
2.1.5 Model błony biologicznej.....	22
2.2 Liposomy.....	25
2.2.1 Metody otrzymywania liposomów	28
2.2.2 Zastosowanie liposomów	31
2.3 Procesy utleniania lipidów	44
2.3.1 Wolne rodniki.....	44
2.3.2 Powstawanie wolnych rodników	45
2.3.3 Procesy utleniania błon biologicznych i czynniki indukujące ten proces	47
2.3.4 Procesy peroksydacji w przemyśle	49
2.4 Substancje aktywne biologicznie	50
2.4.1 Przeciwutleniacze.....	50
2.4.2 Budowa chemiczna i właściwości fizykochemiczne polifenoli	51
2.4.3 Występowanie związków polifenolowych oraz ich rola w roślinach	55
2.4.4 Aktywność biologiczna związków polifenolowych.....	56
2.4.5 Oddziaływanie flawonoidów z błoną lipidową	59
2.4.6 Polifenolowe ekstrakty roślinne	60
3 CEL PRACY.....	67
4 MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ.....	68
4.1 Odczynniki	68

4.2	Roztwory	68
4.3	Materiał badawczy	69
4.3.1	Ekstrakty roślinne.....	69
4.3.2	Flawonoidy	70
4.3.3	Lipidy	70
4.4	Metodyka badań	70
4.4.1	Otrzymywanie liposomów	70
4.4.2	Otrzymywanie błon liposomowych do badań fluorymetrycznych	71
4.4.3	Pomiar inhibicji utleniania liposomów EYPC– TBARS	71
4.4.4	Gaszenie wolnych rodników DPPH [•]	74
4.4.5	Oznaczanie zdolności do redukowania jonów żelaza – FRAP.....	75
4.4.6	Określanie całkowitej zawartości polifenoli.....	75
4.4.7	Określanie całkowitej zawartości flawonoidów	76
4.4.8	Określanie zawartości antocyjanów.....	76
4.4.9	Chelatowanie jonów żelaza	76
4.4.10	Wyznaczanie współczynników podziału pomiędzy oktanol i wodę (P).....	77
4.4.11	Wyznaczanie stałych dysocjacji w układzie liposomy EYPC : bufor.....	77
4.4.12	Badania wpływu karboksylfluoresceiny (CF)	78
4.4.13	Pomiar efektywności zamykania karboksylfluoresceiny (CF)	79
4.4.14	Badania rozmiarów liposomów	80
4.4.15	Badania anizotropii fluorescencji sondy DPH	80
4.4.16	Wpływ ekstraktów roślinnych oraz flawonoidów na anizotropię sondy TMA-DPH	80
4.4.17	Badania efektywności zamykania przeciwutleniaczy w nośnikach liposomowych FAT-s.....	81
4.4.18	Obliczenia statystyczne.....	82
5	WYNIKI I ICH OMÓWIENIE.....	83
5.1	Ekstrakty polifenolowe	83
5.1.1	Pomiar inhibicji utleniania liposomów EYPC w obecności ekstraktów polifenolowych –TBARS	83
5.1.2	Gaszenie wolnych rodników DPPH [•] przez ekstrakty roślinne	86
5.1.3	Oznaczanie zdolności ekstraktów polifenolowych do redukowania jonów żelaza – FRAP	87

5.1.4	Określanie całkowitej zawartości polifenoli w ekstraktach roślinnych.....	87
5.1.5	Określanie całkowitej zawartości flawonoidów w ekstraktach roślinnych.....	88
5.1.6	Określanie zawartości antocyjanów w ekstraktach roślinnych.....	88
5.1.7	Chelatowanie jonów żelaza przez ekstrakty roślinne	89
5.1.8	Wyznaczanie współczynników podziału ekstraktów roślinnych pomiędzy oktanol i wodę (P).....	90
5.1.9	Wyznaczanie stałych dysocjacji ekstraktów roślinnych w układzie liposomy EYPC:bufor	90
5.2	Flawonoidy.....	91
5.2.1	Pomiar inhibicji utleniania liposomów EYPC w obecności flawonoidów - TBARS	91
5.2.2	Gaszenie wolnych rodników DPPH [•] przez flawonoidy	95
5.2.3	Oznaczanie zdolności flawonoidów do redukowania jonów żelaza – FRAP	95
5.2.4	Chelatowanie jonów żelaza przez flawonoidy.....	96
5.2.5	Wyznaczanie współczynników podziału flawonoidów pomiędzy oktanol i wodę (P)	97
5.2.6	Wyznaczanie stałych dysocjacji flawonoidów w układzie liposomy EYPC : bufor	98
5.3	Badania właściwości fizycznych liposomów	98
5.3.1	Badania wpływu karboksylfluoresceiny (CF)	98
5.3.2	Pomiar efektywności zamykania karboksylfluoresceiny (CF)	100
5.3.3	Badania rozmiarów liposomów	100
5.3.4	Badania anizotropii fluorescencji sondy DPH	105
5.4	Tworzenie nośnika liposomowego	106
5.4.1	Wpływ ekstraktów roślinnych oraz flawonoidów na anizotropię fluorescencji sondy TMA-DPH....	106
5.4.2	Badania efektywności zamykania przeciwutleniaczy w nośnikach liposomowych FAT-s.....	107
6	DYSKUSJA	110
7	WNIOSKI	130
8	LITERATURA	133
	ZAŁĄCZNIKI	151

SKRÓTY I SYMBOLE STOSOWANE W PRACY

AA - kwas askorbinowy (ang. ascorbic acid)

AAPH - 2,2'-azo-bis(2-amidynopropan)

(ang. 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride)

BHA - izobutylohydroksyanizol (ang. butylated hydroxyanisole)

BHT - 3,5-diizobutylo-4-hydroksytoluen (ang. butylated hydroxytoluene)

C - katechina (ang. catechin)

CF - 5(6)-karboksylfluoresceina (ang. 5(6)-carboxyfluorescein)

CG - galusan katechiny (ang. (+)-catechin gallate)

DLS - dynamiczne rozproszenie światła (ang. dynamic light scattering)

DMF - dimetyloformamid (ang. dimethylformamide)

DPH - 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrien (ang. 3-*p*-(6-phenyl)-1,3,5-hexatrienyl)

EC - (-)-epikatechina (ang. (-)-epicatechin)

ECG - galusan epikatechiny (ang. (-)-epicatechin-3-gallate)

EGC - epigalokatechina (ang. (-)-epigallocatechin)

EGCG - galusan epigalokatechiny (ang. epigallocatechin gallate)

EYPC - fosfatydylocholina żółtka jaja kurzego (ang. egg yolk phosphatidylcholine)

FAT - metoda otrzymywania liposomów poprzez zamrażanie i rozmrażanie

(ang. freezing and thawing)

FAT liposomy - liposomy wielowarstwowe otrzymane metodą FAT

FAT-s liposomy - liposomy otrzymane metodą FAT, a następnie poddane sonifikowaniu

FM - świeża masa (ang. fresh mass)

FRAP - zdolność redukcji jonów żelaza (ang. Ferric Ion Reducing Antioxidant Power)

GAE - ekwiwalent kwasu galusowego (ang. gallic acid equivalent)

GC - galokatechina (ang. (+)-gallocatechin)

GCG - galusan galokatechiny (ang. (+)-gallocatechin gallate)

GP - polaryzacja uogólniona (ang. generalized polarization)

GUV - liposomy olbrzymie (ang. giant unilamellar vesicles)

H_I - struktura heksagonalna lipidów

H_{II} - odwrócona faza heksagonalna lipidów

HIV - ludzki wirus niedoboru immunologicznego (ang. human immunodeficiency virus)

IC₅₀ - stężenie przeciwutleniacza hamujące w 50 % proces peroksydacji lipidów

(ang. inhibition concentration)

- L_{α} - struktura ciekłokrystaliczna dwuwarstwy lipidowej
- $L_{\beta'}$ - struktura żelu dwuwarstwy lipidowej
- LCL - długokrążące liposomy (ang. long circulating liposomes)
- LCST - dolna krytyczna temperatura rozpuszczania
(ang. lower critical solution temperature)
- Log P - logarytm ze współczynnika podziału oktanol:bufor
- LUV - duże jednowarstwowe liposomy (ang. large unilamellar vesicles)
- MDA - malonowy dialdehyd (ang. malon dialdehyde)
- MLV - wielowarstwowe liposomy (ang. multi lamellar vesicles)
- MVV - wielopęcherzykowe liposomy (ang. multi vesicular vesicles)
- NNKT - niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe
- P - współczynnik podziału oktanol:bufor
- PC - fosfatydylocholina (ang. phosphatidylcholine)
- PCS - spektroskopia korelacji fotonowej - metoda pomiaru wielkości cząstek oparta na rozpraszaniu światła lasera (ang. photon correlation spectroscopy)
- PE - fosfatydyloetanolamina (ang. phosphatidylethanolamine)
- PEG - glikol polietylenowy (ang. polyethylene glycol)
- PG - fosfatydyloglicerol (ang. phosphatidylglycerol)
- PGe - galusan propylu (ang. propyl gallate)
- PI - fosfatydyloinozytol (ang. phosphatidylinositol)
- PS - fosfatydyloseryna (ang. phosphatidylserine)
- RE - ekwiwalent rutyny (ang. rutine equivalent)
- RES - komórki żerne układu siateczkowo-śródbłonkowego
(ang. RES - reticuloendothelial system)
- REV - metoda otrzymywania liposomów - odparowanie metodą faz odwróconych
(ang. reverse-phase evaporation)
- RFA - reaktywne formy azotu (ang. reactive nitrogen species - RNS)
- RFT - reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species - ROS)
- SUV - małe jednowarstwowe liposomy (ang. small unilamellar vesicles)
- TBA - kwas tiobarbiturowy (ang. 2-thiobarbituric acid)
- TBARS - substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym
(ang. thiobarbituric acid reactive substances)
- TBHQ - *tert*-butylohydrochinon (ang. *tert*-butylhydroquinone)
- TCA - kwas trójchlorooctowy (ang. trichloroacetic acid)

TEAA - ekwiwalent potencjału przeciwrodnikowego Troloksu (ang. Trolox Equivalent Antiradical Activity)

TEAC - ekwiwalent potencjału przeciwutleniającego Troloksu (ang. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

T_{pf} - temperatura głównej przemiany fazowej (ang. phase transition temperature)

TMA-DPH - p-toluenosulfonian 1-(4-trimetyloamoniofenylo)-6-fenylo-1,3,6-heksantrien (ang. N,N,N-Trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl)phenylammonium p-toluenesulfonate)

TNF- α - czynnik martwicy nowotworów α (ang. tumor necrosis factor- α)

TPTZ - tripirydylotriazyna (ang. 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine)

TRIS - 2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiol
(ang. 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3 - propanediol)

Triton X-100 - eter glikolu polietylenowego i tert oktylofenolu n = PEG (9-10)

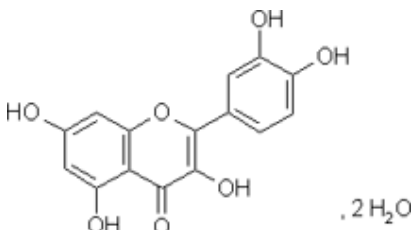
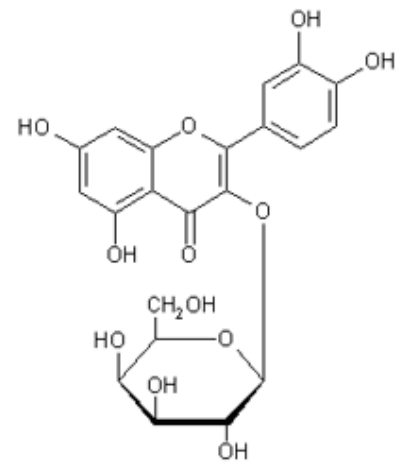
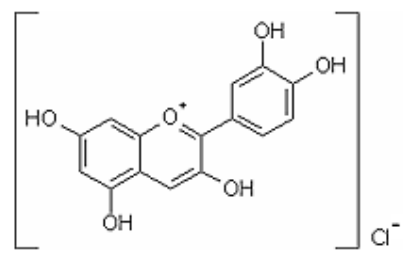
Troloks - kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowy
(ang. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

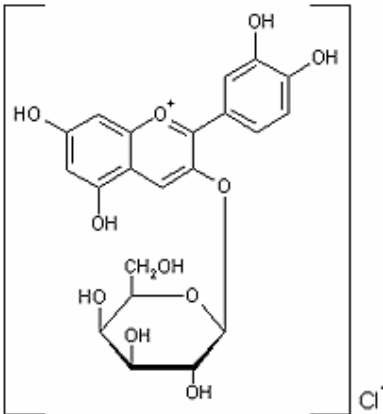
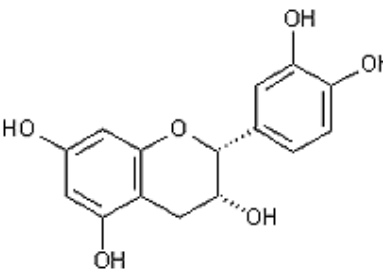
TSL - termowrażliwe liposomy (ang. thermosensitive liposomes)

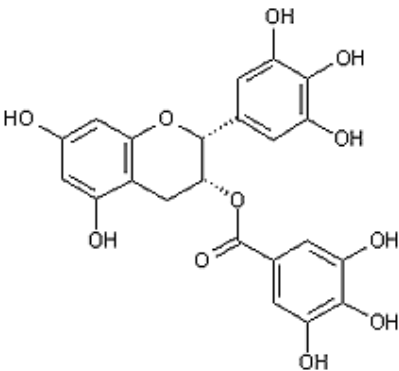
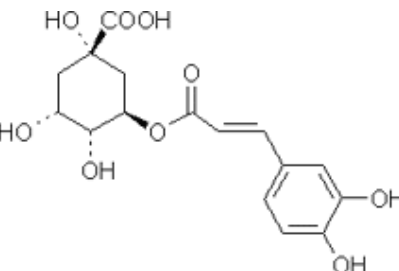
VET - metoda otrzymywania liposomów - technika przeciskania przez filtry
(ang. vesicles by extrusion technique)

Zestawienie badanych flawonoidów zebrano w tabeli 1.

Zestawienie badanych lipidów zamieszczono w tabeli 2.

NAZWA POLSKA	NAZWA ANGIELSKA	SYNONIMY ANGIELSKIE	WZÓR STRUKTURALNY	WZÓR SUMARYCZNY	M _{cz} [g/mol]	POCHO-DZENIE
kwercetyna	quercetin dihydrate	3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone dihydrate 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one dihydrate		C ₁₅ H ₁₀ O ₇ · 2H ₂ O	338,27	Sigma
kwercetyno-3-galaktozyd	quercetin-3-D-galactoside	- Hyperin - Hyperoside		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,38	Extrasynthese (France)
cyjanidyna	cyanidin chloride	cyanidin-3,5-di-O-glucoside		C ₁₅ H ₁₁ O ₆ Cl	322,70	Extrasynthese (France)

NAZWA POLSKA	NAZWA ANGIELSKA	SYNONIMY ANGIELSKIE	WZÓR STRUKTURALNY	WZÓR SUMARYCZNY	M _{cz} [g/mol]	POCHODZENIE
cyjanidyno-3-galaktozyd	cyanidin 3-O-galactoside chloride	- Idaein chloride 3-(galactosyloxy) 3',4',5,7-tetrahydroxyflavylium chloride		C ₂₁ H ₂₁ ClO ₁₁	484,84	Extrasynthese (France)
epikatechina	(-)-epicatechin	(-)-<i>cis</i>-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavane (2<i>R</i>,3<i>R</i>)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2<i>H</i>)-benzopyran-3,5,7-triol		C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,27	Sigma

NAZWA POLSKA	NAZWA ANGIELSKA	SYNONIMY ANGIELSKIE	WZÓR STRUKTURALNY	WZÓR SUMARYCZNY	M _{cz} [g/mol]	POCHODZENIE
galusan epigalokatechiny	(-)-epigallocatechin gallate (EGCG)	- o (-)-cis-3,3',4',5,5',7-hexahydroxy-flavane-3-gallate - o (-)-cis-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol 3-gallate		C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	458,37	Sigma
kwask chlorogenowy	chlorogenic acid	- o 3-(3,4-dihydroxycinnamoyl)quinic acid - o 1,3,4,5-tetrahydroxycyclohexanecarboxylic acid 3-(3,4-dihydroxycinnamate)		C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,31	Sigma

M_{cz} – masa cząsteczkowa [g/mol]

Tab. 1. Flawonoidy zastosowane w niniejszej pracy

SYMBOL	OZN.	POLSKA NAZWA	ANGIELSKA NAZWA ZWYCZAJOWA	ANGIELSKA NAZWA SYSTEMATYCZNA	WZÓR	M _{cz} [g/mol]	T _p [° C]
DLauPC	12:0	dilauroilofosfatydylocholina	1,2-dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	1,2-didodecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	C ₃₂ H ₆₄ NO ₈ P	621,83	ok. 0
DMPC	14:0	dimirystoilofosfatydylocholina	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	1,2-ditetradecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	C ₃₆ H ₇₂ NO ₈ P	677,93	24
DPPC	16:0	dipalmitoilofosfatydylocholina	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	1,2-dihexatetradecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	734,04	42
DSPC	18:0	distearoilofosfatydylocholina	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	1,2-dioctadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	C ₄₄ H ₈₈ NO ₈ P	790,15	55
DAPC	20:0	diarachidoilofosfatydylocholina	1,2-diarachidoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	1,2-dieicosanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	C ₄₈ H ₉₆ NO ₈ P	846,25	66
DBPC	22:0	dibehenoilofosfatydylocholina	1,2-dibehenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	1,2-didocosanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	C ₅₂ H ₁₀₄ NO ₈ P	902,36	---
DOPC	18:1	dioleoilofosfatydylocholina	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	1,2-di(cis-9-octadecenoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	786,11	- 23
DLPC	18:2	dilinoleilofosfatydylocholina	1,2-dilinoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	1,2-di(cis-9,12-octadecadienoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	782,08	- 53
DLinPC	18:3	dilinolenoilofosfatydylocholina	1,2-dilinolenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	1,2-di(cis-9,12,15- octadecatrienoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	C ₄₄ H ₇₆ NO ₈ P	778,20	- 63
DArchPC	20:4	diarachidonoilofosfatydylocholina	1,2-diarachidonoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	1,2-di(cis-5,8,11,14- eicosatetraenoyl)- <i>sn</i> -glycero-3- phosphocholine	C ₄₈ H ₈₀ NO ₈ P	830,14	- 70
HSPC	HSPC	uwodorniona fosfatydylocholina sojowa	hydrogenated soy phosphatidylcholine	---	---	---	---
EYPC	PC	fosfatydylocholina z żółtka jaja kurzego	egg yolk phosphatidylcholine	---	---	---	---

M_{cz} – masa cząsteczkowa [g/mol]

T_p – temperatura przemiany fazowej [°C]

Tab. 2. Lipidy zastosowane w niniejszej pracy

1 STRESZCZENIE

Rozwój chemii i produkcji leków syntetycznych początkowo zdominował rynek farmaceutyczny. Efekty terapii lekami syntetycznymi są szybciej odczuwalne, jednak prawie zawsze towarzyszą im działania uboczne. Z drugiej strony obniżenie kosztów leczenia i konieczność zapobiegania chorobom cywilizacyjnym takim jak: choroba wieńcowa czy nowotworowa sugeruje potrzebę poszukiwania nowych substancji, w tym substancji nietoksycznych jakimi są preparaty pochodzenia naturalnego. Działanie wszechobecnych wolnych rodników wpływa na organizmy żywe, w warunkach stresu oksydacyjnego skutkując powstawaniem stanów zapalnych, będących przyczyną różnych chorób. Stres oksydacyjny przyspiesza także procesy starzenia. Z tego powodu konieczne jest znalezienie substancji, tzw. przeciwutleniaczy egzogennych, mogących chronić organizm przed szkodliwymi skutkami działania wolnych rodników. Najkorzystniej jest aby zbilansowana i urozmaicona dieta dostarczała odpowiednich ilości takich substancji. Konieczne jest jednak dostarczenie przeciwutleniaczy w postaci np. suplementów diety, szczególnie w przypadku źle zbilansowanej diety, podeszłego wieku czy nadmiernego wysiłku fizycznego, kiedy to organizm nie syntetyzuje odpowiedniej ilości endogennych przeciwutleniaczy. W procesach starzenia się skóry dostarczenie substancji odżywczych wiąże się z użyciem kosmetyków (np. kremów) oddziałujących bezpośrednio na skórę.

Właściwości przeciwutleniające posiada wiele ekstraktów polifenolowych uzyskanych z powszechnie dostępnych roślin. Zainteresowanie naturalnymi przeciwutleniaczami, które mogłyby zastąpić syntetyczne, drogie oraz niekiedy toksyczne ich odpowiedniki uzyskiwane na drodze chemicznej, zasugerowało temat podjęty w niniejszej pracy. Trwające intensywne badania, mające na celu znalezienie skutecznych naturalnych przeciwutleniaczy, są próbą odpowiedzi na wciąż rosnący popyt na zastosowanie tego typu związków. Dane literaturowe potwierdzają korzystne działanie polifenoli na zdrowie i urodę. Związki polifenolowe posiadają m.in. właściwości przeciwzapalne i wzmacniające naczynia krwionośne. Wykazują także działanie inhibicyjne w stosunku do enzymów biorących udział w inicjacji nowotworów, a poprzez tworzenie kopigmentów z DNA chronią kwas nukleinowy przed mutacjami. Substancje z tej grupy hamują agregację płytek krwi, poprawiają ostrość widzenia oraz obniżają poziom cholesterolu i glukozy w komórkach.

Przeciwutleniacze o wysokiej aktywności mogą być wykorzystane w praktyce między innymi w przemyśle spożywczym. Chronią one np. produkty żywnościowe o wysokiej zawartości tłuszczu przed jego utlenianiem (np. mięso i jego produkty, wysokotłuszczowe sery, wyroby cukiernicze). W przemyśle kosmetycznym - jako składniki kremów pełnią zarówno funkcje ochronne, odżywcze, jak i regenerujące. Obecne w kremach mogą spełniać dwojaką rolę: regenerują skórę i chronią ją przed działaniem promieniowania UV (jako filtry), oraz chronią składniki kremów przed ich utlenianiem. Procesy utleniania tych składników powodują niekorzystne zmiany w tym między innymi barwy, konsystencji czy zapachu tych preparatów.

Głównym celem podjętych badań w pierwszym etapie było zbadanie aktywności przeciwutleniającej wybranych ekstraktów polifenolowych, oraz niektórych obecnych w ekstraktach flawonoidów w odniesieniu do modelowych błon liposomów, uformowanych z fosfatydylocholiny. Dodatkowo podjęto próbę określenia prawdopodobnego mechanizmu ich działania przeciwutleniającego. Przebadano ekstrakty polifenolowe z następujących surowców:

- owoców: berberysu, derenia, mahonii,
- ziela: ogórecznika, arniki i zielonej herbaty
- oraz następujące flawonoidy: cyjanidynę, cyjanidyno-3-galaktozyd, kwercetynę, kwercetyno-3-galaktozyd, kwas chlorogenowy, galusan epigalokatechiny (EGCG) i epikatechinę.

Ponadto badania miały na celu określanie efektywności zamykaniaa najefektywniejszych przeciwutleniaczy, wyłonionych w pierwszym etapie badań, w liposomach uformowanych z różnych fosfolipidów z dodatkiem lub bez cholesterolu. Badania te poprzedzono określaniem właściwości fizycznych liposomów utworzonych z lipidów o zmieniającej się długości łańcucha acylowego i jego stopnia nienasycenia. Do badań określenia właściwości fizycznych liposomów zastosowano lipidy posiadające w łańcuchach acylowych od 12 do 22 atomów węgla oraz lipidy o różnym stopniu nienasycenia tych łańcuchów posiadające od 1 do 4 wiązań podwójnych. Dla określenia efektywności zamykania przeciwutleniaczy zastosowano te lipidy, które we wcześniejszych badaniach wykazały najlepsze właściwości fizyczne utworzonych z nich liposomów, czyli DPPC, HSPC, EYPC, dioleoilofosfatydylocholinę (18:1) oraz dilynoleilofosfatydylocholinę (18:2).

Uzyskane wyniki świadczą o zróżnicowanej aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów oraz flawonoidów w zależności od rodzaju czynnika utleniania,

tj. AAPH, promieniowania UVC, jonów Fe(II)/askorbinian. Najefektywniejszymi przeciwutleniaczami były ekstrakty zielonej herbaty oraz arniki. Wśród flawonoidów najwyższą aktywność przeciwutleniającą wykazały te, które w dużych ilościach występują w najefektywniejszych przeciwutleniających ekstraktach polifenolowych. Wywnioskowano, że między innymi występowanie tych związków w ekstraktach jest odpowiedzialne za wysoką aktywność ekstraktów. Do najefektywniejszych przeciwutleniających działających flawonoidów należały składniki arniki: kwercetyna, kwercetyno-3-galaktozyd oraz składniki zielonej herbaty: EGCG, a także epikatechina. Zasugerowano, że jednym z możliwych mechanizmów aktywności przeciwutleniającej związków jest zdolność do wychwytywania wolnych rodników ze względu na stwierdzoną w pracy wysoką aktywność przeciwrodnikową w stosunku do modelowego, stabilnego rodnika DPPH[•] przez badane ekstrakty oraz flawonoidy. Za wysoką zdolność do wychwytywania wolnych rodników prawdopodobnie odpowiada zarówno wysoka zawartość polifenoli, jak i flawonoidów w tych ekstraktach. Wykazano zdolność badanych ekstraktów i flawonoidów do redukowania jonów żelaza, natomiast nie stwierdzono zdolności ekstraktów do ich kompleksowania. W przypadku cyjanidyny oraz cyjanidyno-3-galakatozydu zbadano zarówno zdolność do redukowania, jak i do kompleksowania jonów żelaza. Wykazano, że zarówno długość łańcucha acylowego, jak i ilość wiązań podwójnych w cząsteczce lipidu wpływały na efektywność zamykania w liposomach uformowanych z tych lipidów. Struktura cząsteczki lipidu jak i metoda jaką otrzymywano pęcherzyki miały wpływ na rozmiar, na szczelność oraz na płynność błon utworzonych pęcherzyków.

Zbadano wpływ ekstraktów roślinnych oraz flawonoidów na płynność błon liposomów DPPC. Wykazano, że substancje te w niewielkim stopniu lub w ogóle nie wpływały na anizotropię fluorescencji sondy TMA-DPH. Wysokie powinowactwo do błon liposomów w przypadku najefektywniejszych przeciwutleniaczy, tj. ekstraktów z zielonej herbaty i arniki oraz flawonoidów, tj. EGCG, epikatechiny oraz kwercetyny, umożliwiło otrzymanie po raz pierwszy efektywnego zamykania tych substancji polifenolowych w liposomach utworzonych z DPPC, HSPC oraz DPPC i EYPC z dodatkiem i bez cholesterolu.

W pracy zastosowano prostą metodę otrzymywania liposomów, charakteryzujących się wysoką procentową efektywnością zamykania. Uzyskane wyniki badań, w szczególności nad możliwością efektywnego zamykania substancji polifenolowych, oraz wybranych flawonoidów o wysokich właściwościach

przeciwutleniających w liposomach, wskazują na potencjalne możliwości ich zastosowania w przemyśle spożywczym, kosmetycznym oraz farmaceutycznym. W przemyśle spożywczym mogą zostać wykorzystane w celu zabezpieczenia produktów zawierających tłuszcze przed zachodzącymi procesami jełczenia, pogarszającymi właściwości organoleptyczne produktów, lub jako suplementy diety, lub dodatki funkcjonalne do żywności przeznaczone dla np. ludzi starszych i osłabionych.

2 WSTĘP

2.1 Błona biologiczna

2.1.1 Ogólna charakterystyka lipidów występujących w błonach

Lipidy są cząsteczkami nierozpuszczalnymi w wodzie, natomiast dobrze rozpuszczalnymi w substancjach organicznych, takich jak np. chloroform. Łańcuchy kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład lipidów, są nierozgałęzione i zawierają parzystą liczbę, przeważnie od 14 do 24, atomów węgla. Łańcuchy acylowe mogą być w pełni nasycone lub nienasycone i zawierać jedno lub więcej wiązań podwójnych, będących zazwyczaj w konformacji cis. Podział tych związków obejmuje następujące klasy: fosfolipidy, glikolipidy, sfingolipidy oraz sterole. Budowę fosfolipidów, na przykładzie fosfatydylocholiny, przedstawiono na rysunku 1.

W cząsteczce fosfolipidu można wyróżnić trzy segmenty: ufosforylowaną polarną grupę (1), triwęglowy rdzeń glicerolu (2) oraz najczęściej dwa węglowodorowe łańcuchy kwasów tłuszczowych (3). Ufosforylowana głowa, zawierająca w przypadku fosfatydylocholiny cholinę, przyłączona jest do trzeciego węgla glicerolu. Do pozostałych atomów węgla dołączone są dwa łańcuchy kwasów tłuszczowych, które mogą mieć różną długość oraz różny stopień nasycenia. Przykładami innych fosfolipidów występujących w błonach są: fosfatydylocholina (PC), fosfatydyloetanolamina (PE), fosfatydyloglicerol (PG), fosfatydyloinozytol (PI) i fosfatydyloseryna (PS).

Glikolipidy, podobnie jak fosfolipidy, zawierają szkielet glicerolowy, którego pierwszy i drugi atom węgla połączone są z łańcuchami kwasów tłuszczowych. Przy trzecim atomie węgla glicerolu przyłączone są, za pomocą wiązania glikozydowego, reszty cukrowe, np. galaktoza. Glikolipidy zaobserwowano głównie w świecie roślinnym szczególnie w błonach komórek fotosyntetyzujących alg i roślin wyższych.

Sfingolipidy różnią się od fosfolipidów tym, że zamiast glicerolu zawierają sfingozyne. Grupa aminowa szkieletu sfingoizyny połączona jest wiązaniem amidowym z długołańcuchowym kwasem tłuszczowym. Długość oraz stopień nienasycenia łańcucha węglowego kwasu jest zróżnicowany [Stryer 2003].

Ważnym składnikiem błon zwierzęcych jest cholesterol (rys. 2), należący do grupy steroli. Występowanie cholesterolu stwierdzono tylko w organizmach

eukariotycznych, brak go natomiast u organizmów prokariotycznych [Stryer 2003, Arora i wsp. 2004, Shrivastava i Chattopadhyay 2007]. Wprawdzie u roślin zaobserwowano małe ilości cholesterolu, to w zasadzie obecne są tam inne sterole takie jak np. stigmasterol i β -sitosterol, różniące się od cholesterolu bocznymi łańcuchami alifatycznymi. Częsteczki steroli są bardziej apolarne od innych lipidów, o budowie znacznie różniącej się od opisanych powyżej związków amfifilowych. Cholesterol to dwudziestosiedmiowęglowy alkohol o wielopierścieniowej sztywnej strukturze [Hames i Hooper 2002]. W cząsteczce cholesterolu część hydrofilową stanowi niewielka grupa hydroksylowa, która pozostaje na powierzchni błony, natomiast reszta cząsteczki jest zanurzona w błonie (rys. 3) [Dołowy i wsp. 2003].

Sugeruje się, że grupa $-OH$ cząsteczki cholesterolu łączy się z atomem tlenu grupy karbonylowej w polarnej części błony poprzez wiązanie wodorowe, przez co zapobiega krystalizacji lipidów w niskich temperaturach [Yeagle 1988]. Cholesterol w wysokich stężeniach niweluje kooperatywność przejść fazowych lipidów (rys. 4) [Mannock i wsp. 2010].

Cząsteczki cholesterolu zasocjowanie z lipidami chronią je przed procesami oksydacji, ponieważ zmniejszają stopień hydratacji dwuwarstwy, przez co redukują hydrolizę w polarnej części błony [Samuni i wsp. 2000]. W błonie będącej w fazie żelu, cholesterol zwiększa dynamikę ruchów łańcuchów acylowych lipidów, natomiast w fazie krystalicznej wywołuje efekt odwrotny. Obecność cholesterolu w błonie powoduje, że błony stają się mniej przepuszczalne dla wody oraz molekuł w niej rozpuszczalnych [Parasassi i wsp. 1995]. Pomimo różnorodności lipidów w błonach biologicznych w większych ilościach występuje tylko kilka ich typów. Skład lipidowy przykładowych błon biologicznych zebrano w tabeli 3.

BŁONA	SKŁAD LIPIDOWY ZEWNĘTRZNEJ MONOWARTSWY(%)				
	PC	SM	PE	PS	PI
ERYTROCYTY (człowieka)	76	82	20	0	-
ERYTROCYTY (szczura)	62	100	20	6	-
PŁYTKI KRWI (człowieka)	62	-	54	6	34
PŁYTKI KRWI (świni)	40	91	34	6	-
FIBROBLAST (kurczę)	-	-	34	17	-
MIELINA (mózg szczura)	11	6	14	7	-
SYNAPTOSOMY (mózg szczura)	24	3,5	20	8,0	2,0
MITOCHONDRIMUM (błona zewnętrzna, wątroba szczura)	45	2,5	25	1	6,0
SZORSTKIE ER (wątroba szczura)	55	3,0	16	3,0	8,0
GŁADKIE ER (wątroba szczura)	55	12,0	21	-	6,7
E. coli (błona komórkowa)	0	-	80	-	-

Tab. 3. Skład lipidowy przykładowych błon biologicznych, gdzie: PC - fosfatydylocholina, PE - fosfatydyloetanoloamina, SM - sfingomielina, PS - fosfatydyloseryna, ER - endoplazmatyczne retikulum [Devaux 1991, Dołowy i wsp. 2003].

2.1.2 Przemiany fazowe lipidów

Fosfolipidy w dwuwarstwie ulegają zmianom strukturalnym (fazowym) wraz ze zmianami temperatury - wykazują tzw. polimorfizm termotropowy. Temperatura, przy której fosfolipidy przechodzą ze stanu krystalicznego (żelu) do ciekłokrystalicznego nazywa się temperaturą przejścia fazowego (T_{pf}). Przejście to nie musi być pojedynczym aktem, ale może obejmować szereg przejść pośrednich.

Na rysunku 5 przedstawiono termogram przemian fazowych dla DPPC, przy nadmiarze wody, na którym można zauważyć trzy przejścia fazowe. W temperaturze 22,59 °C zachodzi przedprzejście fazowe T_s (ang. subtransition) z fazy krystalicznej L_C do fazy lamellarnej żelu L_{β}' . Łańcuchy węglowodorowe cząsteczek lipidów przyjmują odmienną orientację, z uporządkowanych łańcuchów, prostopadłych do powierzchni dwuwarstwy do odchylonych o pewien kąt w stosunku do pierwotnego położenia. Łańcuchy mogą też rotować wokół długiej osi cząsteczki. W 35 °C zachodzi podprzejście fazowe T_p (pretransition) z fazy lamellarnej żelu L_{β}' do fazy P_{β}' , w której

powierzchnia dwuwarstwy jest pofałdowana, a same łańcuchy układają się heksagonalnie. W tej temperaturze nadal występuje znaczne uporządkowanie lipidów [<http://bioinfo.mol.uj.edu.pl>]. Główne przejście fazowe (ang. main transition - T_m), fazy żelu w fazę krystaliczną ($P_{\beta'}$ - L_{α}) zachodzi w temperaturze 41,3 °C. Łańcuchy acylowe w stanie ciekłokrystalicznym charakteryzują się dużym stopniem nieuporządkowania i dużą ruchliwością.

W błonach utworzonych z dwuwarstwy lipidowej w skład której wchodzi identyczne cząsteczki fosfolipidowe można zaobserwować ostre przejścia fazowe od fazy żelu charakteryzującej się konformacją łańcuchów typu trans, do fazy ciekłokrystalicznej warstwowej o konformacji łańcuchów typu gauche. Struktura lipidów w fazie żelu charakteryzuje się tym, że łańcuchy acylowe są sztywne, równoległe do siebie i nachylone pod pewnym kątem do powierzchni dwuwarstwy, natomiast w fazie ciekłokrystalicznej o strukturze warstwowej, łańcuchy acylowe wykazują duży stopień nieuporządkowania i ruchliwości, a oś podłużna cząsteczki jest prostopadła do powierzchni dwuwarstwy (rys. 6) [Kozubek i wsp. 1996, Walde i Ichikawa 2001].

Temperatura przejścia fazowego jest charakterystyczna dla poszczególnych rodzajów lipidów. Przejście fazowe jest procesem kooperatywnym i ma znaczący wpływ na właściwości dwuwarstwy w tym na jej przepuszczalność. W zakresie temperatur głównego przejścia fazowego dwuwarstwa wykazuje znaczący wzrost przepuszczalności [Kozubek i wsp. 1996].

2.1.3 Ruchliwość dwuwarstwy lipidowej

Dwuwarstwa lipidowa nie jest strukturą statyczną, ponieważ brak w niej kowalencyjnych wiązań. Lipidy wchodzące w skład błony wykazują dużą swobodę ruchu zarówno z punktu widzenia pojedynczej molekuly, jak i zespołu cząsteczek. Na rysunku 7 przedstawiono schematycznie możliwe ruchy cząsteczek lipidowych w dwuwarstwie.

Poszczególne segmenty cząsteczki lipidów, np. jej łańcuchy (1) lub polarne główki (4), mogą wykonywać niezależne ruchy. Cząsteczka lipidowa może wykonywać ruchy rotacyjne względem główki cząsteczki (2), dyfundować w płaszczyźnie błony (3), drgać w kierunku normalnym do błony (5), przeskakiwać w poprzek błony z jednej warstwy do drugiej, tzw. ruchy „flip-flop” (7). Dwuwarstwa lipidowa jest dynamiczna jako całość, co przejawia się w ruchliwości lipidów, która prowadzi do tworzenia pofałdowań (6) [Hames i Hooper 2002, Stryer 2003].

Długość łańcucha acylowego kwasów tłuszczowych oraz jego stopień nienasycenia może mieć wpływ na płynność błon.

Na płynność błony wpływ ma również zawartość cholesterolu. W temperaturze fizjologicznej wzrastająca zawartość cholesterolu w błonie przeszkadza ruchom oscylacyjnym łańcuchów kwasów tłuszczowych, co skutkuje zmniejszeniem płynności błony [Hames i Hooper 2002, Stryer 2003].

Jedną z metod pomiaru płynności błony jest spektroskopia fluorymetryczna z zastosowaniem sond. Cząsteczka zawierająca fluoryzujący chromofor (sonda), wbudowuje się w błonę i poprzez pomiar jej parametrów, takich jak np. zmiany anizotropii fluorescencji, czy intensywności fluorescencji otrzymywane są informacje na temat jej mikrootoczenia, a co za tym idzie stanu błony [Lakowicz 1999]. Zastosowanie odpowiednich sond informuje o zmianach w wybranych strefach błony (rys. 8).

Sonda DPH lokalizuje się w hydrofobowym rdzeniu błony, czyli w strefie III i IV. Sonda TMA-DPH jest kationową pochodną sondy DPH. Obecność ładunku w cząsteczce sondy TMA-DPH sprawia, że kotwiczy się ona w polarnej części błony (strefie I), równolegle do osi cząsteczek lipidów i sięga do strefy III [Dumas i wsp. 1997].

2.1.4 Agregacja związków amfifilowych

Lipidy zawierają w swojej cząsteczce rejony różniące się powinowactwem do środowiska wodnego. Cząsteczka lipidowa zawiera z jednej strony rejon polarny, hydrofilową główkę, z drugiej niepolarnie alifatyczne bądź aromatyczne ugrupowanie, hydrofobowe łańcuchy węglowodorowe. Ambiwalentność lipidów powoduje, że w środowisku wodnym, aby uniemożliwić kontakt regionów hydrofobowych z cząsteczkami wody, tworzą monowarstwy, micelle, struktury wielowarstwowe w fazach heksagonalnych czy lamelarnych. Rodzaj tworzonej struktury zależy od budowy cząsteczki amfifilowej, zawartości wody oraz innych czynników środowiskowych, takich jak np. siła jonowa, pH czy temperatura. Zmiany wymienionych wyżej czynników indukują struktury agregatów tworzonych przez lipidy [Kozubek i wsp. 1996].

Na rysunku 9 przedstawiono struktury agregacyjne lipidów. Fosfolipidy tworzą monowarstwę na granicy woda-powietrze o grubości jednej cząsteczki (1). W miarę przybywania cząsteczek lipidów, w sytuacji gdy ich ilość przekracza liczbę cząsteczek

zdolnych pomieścić się w monowarstwie na powierzchni, tworzą się zamknięte pęcherzyki zbudowane z dwuwarstwy lipidowej, zwane liposomami (2). Wnętrze błony liposomów stanowią hydrofobowe łańcuchy lipidów natomiast na powierzchni zlokalizowane są hydrofilowe główki wykazujące powinowactwo do wody. W postaci pojedynczych cząsteczek (monomerów) w wodzie pozostają tylko niewielkie ilości lipidów (3). Sole kwasów tłuszczowych zawierające jeden łańcuch kwasu tłuszczowego tworzą kulistą strukturę micelną (4), w której hydrofobowe łańcuchy kwasów tłuszczowych są ukryte wewnątrz miceli, a hydrofilowe główki oddziałują z otaczającymi je cząsteczkami wody [Kozubek i wsp. 1996, Hames i Hooper 2002, Dołowy i wsp. 2003].

W przypadku większości fosfolipidów i glikolipidów, które zawierają w swojej cząsteczce dwa łańcuchy kwasów tłuszczowych, zajmującą dużą przestrzeń, uprzywilejowana jest struktura dwuwarstwy. Formowanie się dwuwarstwy jest procesem samorzutnym. Główne czynniki stanowiące o organizacji tej struktury to hydrofobowe oddziaływania van der Walsa, elektrostatyczne oraz wodorowe [Stryer 2003]. Iloraz objętości części hydrofobowej i długości łańcuchów kwasów tłuszczowych do średniego pola powierzchni zajmowanego przez cząsteczkę w błonie nazwano parametrem upakowania (S). Wyrażono go następującym równaniem:

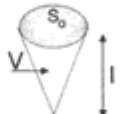
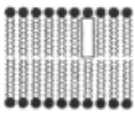
$$S = \frac{V}{A} \cdot L,$$

gdzie: V - objętość hydrofobowej części lipidu, A - średnie pole powierzchni zajmowane przez cząsteczkę w błonie, zaś L - długość łańcuchów kwasów tłuszczowych wchodzących w skład cząsteczki.

W przypadku, gdy wartość parametru S cząsteczki jest mniejsza od wartości jednej trzeciej, to taki lipid tworzy struktury micelarne. Micele tworzone są z reguły przez lipidy zawierające jeden łańcuch węglowodorowy i dużą polarną główkę, np. lizofosfolipidy. Parametr upakowania wahający się w zakresie wartości od jednej drugiej do jedności sugeruje, że lipidy tworzą dwuwarstwę. W taki sposób zachowują się cząsteczki o kształcie cylindrycznym z dwoma łańcuchami i dużą polarną głową np.: fosfatydylocholina, fosfatydyloseryna oraz sfingomielina. Wartość parametru S powyżej jedności, oznacza, że cząsteczka zajmuje stosunkowo małe pole powierzchni w błonie, co skutkuje powstaniem odwróconych miceli o strukturze odwróconej fazy

heksagonalnej H_{II} (rys. 10). Przykładem cząsteczki, której parametr S jest większy od jedności jest fosfatydyloetanolamina.

Na molekularny kształt fosfolipidów ma także wpływ środowisko, a w szczególności obecność protonów oraz kationów dwuwartościowych. W pH różnym od wartości 7,0 fosfolipidy anionowe, np. fosfatydyloseryna, tworzą dwuwarstwę, ponieważ w tych warunkach grupa karboksylowa seryny i grupy fosforanowe są zdysocjowane. Obniżenie pH do 3,0 powoduje uprotonowanie grup, przez co zmniejszenie powierzchni cząsteczki. W niskim pH środowiska następują zmiany odległości między grupami atomów, co sprzyja utworzeniu fazy H_{II} . Kationy, takie jak np. Li^+ , Na^+ , czy K^+ , w odróżnieniu od protonów, nie powodują powstawania fazy H_{II} , a jedynie neutralizację ujemnego ładunku. Powszechnie występujące w komórkach kationy dwuwartościowe, takie jak Ca^{2+} , Mg^{2+} i Mn^{2+} , mają wysokie powinowactwo do fosfolipidów anionowych. W wyniku wiązania się ich do cząsteczki powstaje dwuwarstwa albo przejście dwuwarstwy w fazę heksagonalną H_{II} [Dołowy i wsp. 2003]. W tabeli 4 zestawiono kształty cząsteczek fosfolipidów wynikające z ich budowy chemicznej i struktury przestrzenne, jakie fosfolipidy mogą przyjmować w środowisku wodnym.

PARAMETR UPAKOWANIA (S)	PRZYBLIŻONY KSZTAŁT MOLEKULARNY	TWORZONE STRUKTURY
$< \frac{1}{3}$	stożek 	micele sferyczne 
$\frac{1}{3} - \frac{1}{2}$	stożek ścięty 	micele cylindryczne 
$\frac{1}{2} - 1$	stożek ścięty 	sferyczne dwuwarstwy lipidowe 
~ 1	cylinder 	płaskie dwuwarstwy lipidowe 
> 1	odwrotny stożek ścięty 	odwrócone micele 

Tab. 4. Zależność pomiędzy kształtem cząsteczki i strukturą powstałego agregatu [Israelachvii 1992, Dołowy i wsp. 2003].

2.1.5 Model błony biologicznej

Po raz pierwszy terminu „błona komórkowa” użył w 1855 roku Carl Nageli. Błona komórkowa, zwana również błoną plazmatyczną, stanowi naturalną barierę pomiędzy wnętrzem komórki, a środowiskiem zewnętrznym [Dołowy i wsp. 2003]. Komórki eukariotyczne zawierają dodatkowo błony wewnętrzne, wytyczające granice organelli, takich jak mitochondria, chloroplasty i lizosomy. Błony są wysoce selektywnymi barierami przepuszczalności dla różnych substancji, nie są całkowicie izolującymi ścianami, ponieważ zawierają specyficzne kanały, pompy oraz przenośniki [Stryer 2003]. Płynna mozaika białek zanurzonych w dwuwarstwie lipidowej oraz przyłączonych do niej białek peryferyjnych jest modelem opracowanym w 1972 roku przez dwóch amerykańskich naukowców Jonathana S. Singera i Gartha L. Nicolsona z Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Diego (rys. 11).

Selektywność błon zauważył po raz pierwszy Charles E. Overton w 1895 roku, kiedy to spostrzegł, że substancje rozpuszczalne w tłuszczach wnikały do komórki zdecydowanie łatwiej, aniżeli nierozpuszczalne w nich. Wydedukował na tej podstawie, że tłuszcze są ważnym składnikiem błon. Oprócz lipidów w skład błon wchodzi białka i węglowodany zasocjowane z lipidami oraz białkami, woda i mikroelementy [Garrett i Grisham 2004].

Tielman i wsp. [1997] opracowali, w wyniku symulacji komputerowej, czterostrefowy model błony biologicznej (rys. 12).

Wyróżnili oni w błonie następujące strefy: perturbacji wody (1), międzyfazową (2), miękkich polimerów (3) oraz dekanu (4). Strefa perturbacji wody, o szerokości ok. 1 nm, zaczyna się od miejsca w którym woda zaczyna wyczuwać cząsteczki lipidów, a kończy gdy gęstość lipidów i wody są równe. Obszar ten prawdopodobnie decyduje o oddziaływaniach białek z błoną. W drugiej strefie, międzyfazowej, o szerokości około 0,8 nm, gęstość wody maleje prawie do zera natomiast rośnie gęstość lipidu. Granica faz rozciąga się tam gdzie polarne główki lipidów są zhydratowane, a woda jest związana. Jest to obszar o największej gęstości lipidu i decyduje on o jego właściwościach fazowych, o powstających krzywiznach oraz napięciu powierzchniowym. Trzecia strefa, zwana strefą miękkich polimerów, również ma szerokość 0,8 nm, charakteryzuje się największym uporządkowaniem łańcuchów, czyli najmniejszą płynnością. Strefa trzecia stanowi główną barierę dla przenikających małych molekuł. Strefa dekanu, o szerokości 1,2 nm, obejmuje najdłuższe łańcuchy i charakteryzuje się stosunkowo małą gęstością i dużymi przestrzeniami wolnymi. Jest to najbardziej hydrofobowy obszar błony, jednocześnie łączący obie monowarstwy [Tielman i wsp. 1997].

Błony biologiczne są asymetryczne zarówno pod względem strukturalnym, jak i funkcjonalnym. Każda powierzchnia błony zawiera inne składniki i wykazuje odmienną aktywność enzymatyczną [Stryer 2003]. Błone biologiczną traktuje się obecnie jako twór dynamiczny, asymetryczny, niejednorodny zarówno powierzchniowo, jak i przestrzennie. Wszystkie jej składniki biorą udział w procesach fizjologicznych komórki. Faza ciekłokrystaliczna, w jakiej znajduje się błona biologiczna w warunkach fizjologicznych, zapewnia jej składnikom odpowiednią ruchliwość, niezbędną do pełnienia przez nie określonych funkcji w komórce. Asymetria błony ma swoje odbicie zarówno w rozmieszczeniu lipidów, jak i białek. Lipidy są nieregularnie rozłożone zarówno w każdej z monowarstw błony, jak

i w ramach tej samej monowarstwy tworząc mikrodomeny. Utrzymanie prawidłowego, nierównomiernego rozkładu lipidów jest wymagane dla stabilności mechanicznej błony oraz procesów transportu pęcherzykowego. Na rysunku 13 przedstawiono asymetrię lipidową.

Modelem, obecnie dość dobrze poznanym, służącym do badań błon biologicznych jest błona erytrocytów. Skład lipidowy poszczególnych monowarstw błony erytrocytów różnych ssaków przedstawiono na rysunku 14.

Można zauważyć, że fosfatydyloseryna (PS) występuje tylko w wewnętrznej monowarstwie. Fosfatydyloinozytol (PI) oraz fosfatydyloetanolamina (PE) występują głównie w wewnętrznej monowarstwie błony komórkowej. Fosfatydylocholina (PC) i sfingomielina (SM) obecne są głównie w wewnętrznej monowarstwie tej błony. Cholesterol lokuje się w obu monowarstwach błony, jednak w zewnętrznej monowarstwie jest go więcej. Reszty cukrowe glikoprotein oraz glikoglicerolipidów znajdują się tylko po zewnętrznej stronie dwuwarstwy lipidowej. Należy dodać, że skład lipidowy błony erytrocytów jest charakterystyczny dla danego gatunku ssaków [Weng i wsp. 1996]. W procesach regulujących asymetrię lipidową błon biologicznych zaangażowane są trzy klasy translokaz lipidowych, a mianowicie: ATPazy typu P, transportery ABC oraz skramblazy [Ikeda i wsp. 2006].

W błonie komórkowej mogą występować rejony w których dwuwarstwa lipidowa błony wykazuje zróżnicowanie strukturalne. Rejony te nazywane są domenami. Przykładem istnienia mikrodomen lipidowych są tratwy (ang. rafts). Tratwy to małe (10-200 nm) heterogeniczne wysoko dynamiczne struktury bogate w glikolipidy, cholesterol oraz sfingolipidy [Patra 2008]. Szczególnym składnikiem tratw jest fosfatydyloinozytol. Fosfatydyloinozytol wiąże białka składające się z około 120 aminokwasów (domeny PX). W ten sposób bierze udział w transportowaniu białek do różnych organelli i na zewnątrz komórki. Tratwy lipidowe występują zarówno w błonie komórkowej, jak i np. w błonie aparatu Golgiego komórek zwierzęcych, np. komórek nerwowych, nabłonkowych, limfocytów czy neutrofilii. Do funkcji tratw należy między innymi sortowanie białek i lipidów po obróbce w aparacie Golgiego, zjawisko endocytozy niezależnej od latryny, regulacja przekazywania sygnału oraz wnikanie wirusów [Korade i Kenworthy 2008]. Z tratwami lipidowymi związane są specyficzne białka enzymatyczne i receptorowe, które przed pobudzeniem receptorów błony komórkowej są rozproszone w morzu lipidów. Po pobudzeniu receptora białka skupiają się w obrębie tratw. Wpływanie na zawartość cholesterolu lub dostarczanie komórkom

nasyconych bądź nienasyconych kwasów tłuszczowych umożliwia włączanie i wyłączanie sygnału komórkowego [<http://www.chem.pg.gda.pl>, Patra 2008]. Lipidowy skład, funkcje oraz mechanizmy regulacji poszczególnych raft zostały omówione w pracy Patra [2008].

2.2 Liposomy

Liposomy to zdefiniowane struktury pęcherzykowe, w których wodne przestrzenie ogranicza dwuwarstwa lipidowa [Keller 2001]. Pęcherzyki lipidowe mają charakter koloidów, a ich stabilność determinowana jest przez siły napięcia powierzchniowego. Struktury te zostały odkryte w 1965 roku przez Banghama [Bangham i wsp. 1965]. Pokazał on, że zdyspergowane fosfolipidy w wodnym środowisku tworzą pęcherzykowe struktury o koncentrycznych lamellach, w których każda lamella to dwuwarstwa lipidowa [Yarosh 2001, Walde i Ichikawa 2001, Schroeder i wsp. 2009]. Bangham nazwał te struktury liposomami lub „banghasomami” [Schroeder i wsp. 2009]. Wnętrze lipidowego pęcherzyka stanowi wodna przestrzeń, której skład chemiczny zależy od środowiska w jakim formowano liposomy. Metoda otrzymywania pęcherzyków lipidowych warunkuje ilość dwuwarstw lipidowych w tworzonych liposomach. Pęcherzyki lipidowe mogą być jedno- lub wielo-warstwowe, zawierać odpowiednio jedną lub wiele dwuwarstw lipidowych. Średnica pęcherzyków może wynosić od 20 nm do kilkuset mikrometrów. Liposomy, ze względu na rozmiar, podzielono na trzy grupy. Małe jednowarstwowe liposomy (ang. small unilamellar vesicles - SUV) posiadają średnicę około 20 nm [Walde i Ichikawa 2001]. Liposomy SUV charakteryzuje mała objętość wewnętrzna fazy wodnej dlatego rzadko są stosowane do zamykania substancji hydrofilowych [Kozubek 2004]. Duże jednowarstwowe pęcherzyki o pojedynczej błonie lipidowej (ang. large unilamellar vesicles - LUV) mają średnicę zmieniającą się w zakresie od 100 do 200 nm. Ze względu na pojedynczą dwuwarstwę lipidową mogą służyć jako model do badań procesów fuzji oraz przepuszczalności błon komórkowych. Wielokrotnie osłonięte struktury (ang. multilamellar vesicles - MLV) o rozmiarach 100-200 nm zwykle składają się z wielu koncentrycznych pęcherzyków ograniczających leżące między nimi wodne przestrzenie. Liposomy MLV stosowane są jako nośniki substancji hydrofobowych. Dodatkowo wyróżnić można liposomy wielopęcherzykowe (ang. multivesicular vesicles - MVV) składające się z kilku mniejszych pęcherzyków wspólnie opłaszczonych dwuwarstwą lipidową [Walde i Ichikawa 2001] oraz liposomy

olbrzymie (ang. giant unilamellar vesicles - GUV), o średnicy powyżej 1 mikrometra, które są stosowane między innymi jako model do badań transportu leków [Bagatolli i wsp. 2000].

Konwencjonalne liposomy, utworzone z naturalnych cząsteczek amfifilowych jak np. fosfolipidy, charakteryzują się wysoką biodegradowalnością oraz brakiem toksyczności. Mimo tych zalet nie są stosowane jako nośniki leków ze względu na to, że są łatwo eliminowane z krwioobiegu przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego. Liposomy mogą oddziaływać z białkami obecnymi w osoczu krwi, takimi jak opsoniny, w wyniku czego następuje ich wychwytywanie przez komórki żerne - makrofagi. Dodatkowo naturalne fosfolipidy zawierają znaczną liczbę grup acylowych podatnych na procesy utleniania, które zmniejszają stabilność struktur liposomowych jako nośników leków. Jedną z możliwych modyfikacji konwencjonalnych liposomów są długokrążące liposomy (ang. long circulating liposomes – LCL) zwane również niewykrywalnymi liposomami „stealth”. Liposomy LCL charakteryzują się wydłużonym czasem życia w organizmie ze względu na obniżoną podatność na wychwytywanie przez komórki żerne organizmu. Pojawienie się liposomów LCL uważane jest za przełom w rozwoju liposomowych nośników leków [Massing i Fuxius 2000, Sadzuka i wsp. 2003]. Sposobem zapobiegającym opsonizacji jest inkorporacja na powierzchni dwuwarstwy cząsteczek wysoce hydrofilowych. Należą do nich takie substancje jak: pochodne inozytolu, gangliozyd GM1 lub syntetyczne polimery takie jak np. pochodne glikolu polietylenowego PEG. Wprowadzenie cząsteczek hydrofilowych na powierzchnię pęcherzyków lipidowych powoduje powstawanie wokół nich wodnej otoczki, która izoluje powierzchnię dwuwarstwy uniemożliwiając wiązanie się do niej białek z osocza. Liposomy LCL są stosowane między innymi w terapii nowotworów oraz w diagnostyce różnych schorzeń i stanów zapalnych organizmu [Lindner i wsp. 2008].

Innym problemem związanym z aplikowaniem substancji biologicznie aktywnych zamkniętych w liposomach jest ich ukierunkowane działanie. Uzyskuje się je poprzez przyłączenie do powierzchni liposomów komórkowo-specyficznych ligandów np. przeciwciał mono- lub poliklonalnych, które rozpoznają swoiste dla nich receptory lub antygeny występujące na powierzchni struktur docelowych. Immunoliposomy są stosowane w leczeniu nowotworów [Mastrobattista i wsp. 1999].

W tworzeniu liposomów termowrażliwych (ang. thermosensitive liposomes TSL) wykorzystuje płynność błony liposomowej, zależnej od składu lipidowego

i temperatury otoczenia [Gaber i wsp. 1998, Kono 2001]. Po raz pierwszy liposomy TSL opisane zostały przez Yatvin i wsp. w 1978 roku [Yatvin i wsp. 1978, Lindner i wsp. 2008]. Błona liposomu, który znajduje się w temperaturze poniżej przemiany fazowej (T_{pf}) lipidów, które go budują, znajduje się w fazie żelu i jest stabilna. W temperaturze przewyższającej T_{pf} błona liposomów przechodzi w stan ciekłokrystaliczny, oraz następuje uwolnienie związanej substancji. Mechanizm ukierunkowanego działania liposomów TSL oparty jest na różnicy temperatur pomiędzy zdrową, a chorą tkanką, która objęta stanem zapalnym ma podwyższoną temperaturę. Do formowania liposomów TSL wykorzystywane są lipidy o długich nasyconych łańcuchach, które w określonej temperaturze ulegają przemianie fazowej. Liposomy utworzone z DPPC o temperaturze przejścia fazowego w okolicy 41 °C, po dodaniu do niej niewielkiej ilości DSPC o temperaturze T_{pf} około 55 °C, będą wolniej uwalniały zamkniętą w nich substancję ponieważ T_{pf} tak utworzonego liposomu została podwyższona do około 43 °C. Dodatek lizofosfatydylocholiny do liposomów uformowanych z DPPC powoduje obniżenie T_{pf} do około 40 °C, co skutkuje tym, że zamknięta substancja jest uwalniana szybciej [Kono 2001]. Inny przykład składu lipidowego liposomów termowrażliwych to mieszanina DPPC z HSPC, CHOL oraz PEG-PE w stosunku molowym 100:50:30:6 [Gaber i wsp. 1996].

Zjawisko wrażliwości błon liposomów na temperaturę nie zawsze jest pożądane. W takich przypadkach wprowadzane są do składu lipidowego substancje niwelujące podwyższenie przepuszczalności dwuwarstwy w temperaturze T_{pf} takie jak np. cholesterol. Sterol ten działa dwójście na ruchliwość cząsteczek lipidów w dwuwarstwie. Poniżej T_{pf} upłynnia błonę poprzez dezorganizację jej struktury. Powyżej T_{pf} zwiesza uporządkowanie struktury błony powodując jej usztywnienie. W konsekwencji stan upakowania cząsteczek powyżej i poniżej T_{pf} jest podobny i zanika termotropowe przejście fazowe. Błona traci wrażliwość na zmiany temperatury. Wpływ wzrastającej zawartości cholesterolu na zanik T_{pf} przedstawiono na rysunku 4 oraz zostało omówione w rozdziale 2.1.1 niniejszej pracy.

Liposomy wrażliwe od pH zawierają dodatkowe składniki, które modyfikują błony w zależności od kwasowości środowiska. W pH obojętnym obdarzone są wypadkowym ładunkiem, natomiast w obniżonym pH tracą go wraz ze zdolnością do stabilizowania błony i wykazują właściwości fuzjogenne. Stosowane do modyfikacji pęcherzyków lipidowych polimery polikationowe, indukują fuzję z ujemnie naładowaną błoną komórek [Stebelska i wsp. 2002, Felber i wsp. 2011]. Liposomy pH-wrażliwe

stosowane są np. do zamykania enzymów naprawiających uszkodzone przez promieniowanie UV cząsteczki DNA [Yarosh 2001].

Wpływ substancji zamkniętych w liposomach wrażliwych na światło indukowany jest światłem. Liposomy te zawierają łańcuchy acylowe, w których obecne są azobenzenowe chromofory lub cyjaniny. Poddanie liposomów zawierających cyjaniny naświetlaniu światłem o długości fali 550 nm powoduje destabilizację dwuwarstwy [Stebelska i wsp. 2002].

Kationowe liposomy charakteryzują się obecnością syntetycznych kationowych cząsteczek amfifilowych. Stosowane są głównie w terapii genowej ze względu na ich niską toksyczność oraz możliwość tworzenia kompleksu z DNA, co pozwala na wprowadzenie obcego DNA plazmidowego (pDNA) do komórki [Zheng i wsp. 2009].

Modyfikacją kationowych liposomów są magnetoliposomy zamykające wraz z lekiem drobiny magnetytu (Fe_3O_4). Zawartość magnetytu powoduje, że liposomy wykazują zmienną wrażliwość wobec niejednorodnych pól magnetycznych, co zostało wykorzystywane w kierowaniu tych struktur do określonych tkanek guza. Magnetoliposomy stosowane są w terapii genowej np. w złośliwym mięsaku kościopochodnym, pierwotnym nowotworze tkanki kostnej [Zheng i wsp. 2009].

2.2.1 Metody otrzymywania liposomów

Liposomy powstają spontanicznie w wyniku minimalizacji całkowitej energii brzegowej następującej w czasie zakrzywiania płaskiej dwuwarstwy, aż do utworzenia zamkniętych struktur [Kozubek 2004]. Walde i Ichikawa [2001] oraz Mozafari [2005] uważają, że nie jest konieczne dostarczenie energii (sonifikacji, homogenizacji, ogrzewania czy mieszania) aby nastąpiło zakrzywienie płaskiej powierzchni dwuwarstwy lipidowej, a w konsekwencji jej zamknięcie w kulistą strukturę. Formowanie liposomów wymaga podwyższenia temperatury jego składników lipidowych powyżej ich temperatury przejścia fazowego (T_{pf}). Poniżej T_{pf} lipidy są w stanie żelu i mogą nie tworzyć zamkniętych ciągłych struktur [Mozafari 2005]. Formowanie liposomów przeprowadza się przeważnie w temperaturze przewyższającej temperaturę przejścia fazowego lipidów tworzących błonę o od 5 do 10 °C [Walde i Ichikawa 2001].

Istnieje wiele metod otrzymywania pęcherzyków lipidowych. Przykładowe metody przedstawiono schematycznie na rysunku 15.

W tabeli 5 zestawiono metody otrzymywania liposomów oraz rodzaje pęcherzyków lipidowych jakie powstają w wyniku zastosowanych procedur.

METODA	RODZAJ LIPOSOMÓW
hydratacja suchego filmu lipidowego	MLV
cykliczne zamrażanie-rozmrażanie (FAT)	MLV
dehydratacja-rehydratacja (DRV)	
destrukcja falami ultradźwiękowymi - sonifikowanie	SUV
wstrzykiwanie roztworów etanolowych	SUV
kalibracja przez filtry poliwęglanowe - ekstruzja (VET)	LUV, SUV
odparowanie metodą faz odwróconych (REV)	LUV
zastosowanie prasy Frencha	SUV
dializa detergentowa	LUV

Tab. 5. Przykłady metod otrzymywania liposomów

Hydratacja suchego filmu lipidowego tzw. metoda Banghama - powoduje powstawanie liposomów MLV [Sandström i wsp. 2005], które mają więcej niż 10 warstw [Walde i Ichikawa 2001]. Metoda ta polega na rozpuszczaniu lipidów w organicznym rozpuszczalniku np. chloroformie, który to następnie zostaje całkowicie odparowany na wyparce rotacyjnej lub w strumieniu azotu. Lipid następnie zostaje dokładnie osuszony w eksykatorze pod próżnią. Powstały suchy film lipidowy zostaje uwodniony w buforze i wytrząsany powyżej temperatury przejścia fazowego (T_{pf}) lipidów formujących liposomy [Walde i Ichikawa 2001, Sadzuka i wsp. 2002, Kozubek 2004]. Pęcherzyki utworzone przez hydratowanie suchego filmu lipidowego są bardzo niejednorodne pod względem wielkości [Zhu i Szostak 2009]. Ujednolicenie ich rozmiarów można uzyskać poprzez kilkakrotnie przeciskanie ich przez filtry poliwęglanowe o żądanej średnicy porów w temperaturze powyżej T_{pf} dla lipidów tworzących liposomy [Walde i Ichikawa 2001]. Taka kalibracja prowadzi do powstania liposomów SUV lub LUV, o zdefiniowanej średnicy w zależności od wielkości porów w zastosowanych filtrach poliwęglanowych [Soto i wsp. 2002, Paiva-Martins i wsp. 2003]. Filtry poliwęglanowe stosowane do kalibracji liposomów charakteryzują się jednorodną wielkością porów w postaci kanałów o okrągłych przekrojach niemal prostopadłych do powierzchni ich błonki. Do kalibracji wymiarowej stosowane są

ręczne ekstrudery albo kalibratory ciśnieniowe [Kozubek 2004], a otrzymane w ten sposób liposomy, zwane VET, charakteryzują się homogennością rozmiarów. Dla ułatwienia zredukowania rozmiarów liposomów stosuje się kilka rodzajów filtrów, zaczynając przeciskanie przez filtr o największych porach [Walde i Ichikawa 2001]. Poddanie zawiesiny pęcherzyków lipidowych VET kilkukrotnym cyklom zamrażania (w ciekłym azocie, lub suchym lodzie) i rozmrażania powyżej T_{pf} prowadzi do wysokiej efektywności zamykania w ich wnętrzu substancji oraz do redukcji liczby warstw - powstają liposomy VET-FAT [Walde i Ichikawa 2001, Soto i wsp. 2003, Kozubek 2004]. W przypadku odwrócenia kolejności czynności, to znaczy najpierw poddaniu zawiesiny cyklicznemu zarażaniu i rozmrażaniu, a następnie kalibracji przez filtry, uzyskuje się liposomy FAT-VET [Gaber i wsp. 1996, Arora i wsp. 1998, Walde i Ichikawa 2001, Silvander i wsp. 2003, Shrivastava i Chattopadhyay 2007].

Poddawanie zawiesiny liposomów MLV dezintegracji ultradźwiękami (sonifikowaniu) prowadzi do utworzenia liposomów SUV [Szoka i Papahadjopoulos 1978, Verstraeten i wsp. 2003], o średnicy poniżej 50 nm [Walde i Ichikawa 2001].

W celu otrzymania liposomów o żądanych cechach stosowane są różne kombinacje w/w sposobów ich formowania. Należy zaznaczyć, że tylko metoda kalibrowania daje homogenną mieszaninę pęcherzyków lipidowych. Inne metody skutkują wysoką heterogennością rozmiarów liposomów [Mozafari 2005]. Ważnym parametrem charakteryzującym nośniki liposomowe jest utrzymywanie leku w ich wnętrzu przez dłuższy czas. Uzyskać można to wykorzystując tzw. ładowanie gradientem pH. Metoda ta dotyczy wyłącznie tych substancji, które rozpuszczają się w fazie wodnej oraz wykazują słabe właściwości kwasowe lub zasadowe. Ładowanie gradientem pH stosowane jest w przypadku zamknięcia we wnętrzu liposomów np. doksorubicyny. Najpierw zamknięty zostaje w pęcherzykach siarczan amonu, a wymieniane środowisko zewnętrzne np. na sól fizjologiczną i roztwór leku. W takich warunkach dysocjujący siarczan amonu wewnątrz liposomów, po wnikięciu obojętnej formy leku, utworzy jon siarczanowy oraz amonowy. Jon amoniowy oddając swój proton słabej zasadzie - doksorubicynie, tworzy amoniak, który z łatwością opuszcza liposom. Wewnątrz liposomów pozostaje siarczan, który wpływa na równowagę dysocjacji wody, przez co zakwasza środowisko. Lek ulega następnie dysocjacji, co uniemożliwia jego wyciek. Gradient pH podtrzymuje lek w środku pęcherzyka nawet do 15 h po zaaplikowaniu go w tej formulacji do krwioobiegu. Uwolnienie leku z liposomów następuje po zredukowaniu gradientu pH. Dzieje się to poprzez działanie na miejsce lokalizacji

liposomów wyższą temperaturą, która zwiększa przepuszczalność błony lub poprzez użycie jonoforów np. nigerycyny [Gaber i wsp. 1996].

Istnieje wiele technik otrzymywania liposomów jednak nie są one jak dotychczas wystarczająco dobre do otrzymania pęcherzyków lipidowych, które mogłyby być nośnikami substancji aktywnych, które są często wrażliwe na mechaniczny stres taki jak sonifikowanie, homogenizacja, wysokie ciśnienie czy wpływ odczynników chemicznych [Mozafari 2005]. Z tego powodu trwają badania nad efektywnymi metodami otrzymywania nośników liposomowych.

Ulokowanie substancji aktywnej w liposomach zależy od stopnia jej hydrofilowości [Massing i Fuxius 2000, Nii i Ishii 2005]. Substancje hydrofilowe zamykane są we wnętrzu, natomiast substancje hydrofobowe w lipofilowej błonie [Keller 2001, Saraf 2010]. Naładowane cząsteczki zarówno o charakterze lipofilowym jak i hydrofilowym asocjowane są na powierzchni liposomów (rys.16) [Honeywell-Nguyen i Bouwstra 2005].

Ważnym etapem podczas tworzenia nośników liposomowych jest moment dodawania substancji, która ma zostać w nich zamknięta. Dla stworzenia nośnika substancji lipofilowej należy dodać ją do mieszaniny lipidów przed odparowaniem organicznego rozpuszczalnika, a następnie nawadniać wysuszony film lipidowy z substancją aktywną [Ghosh i wsp. 1995, Gaber i wsp. 1996]. W przypadku zamykania substancji hydrofilowej, należy ją dodać rozpuszczoną w buforze podczas nawadniania suchego filmu lipidowego [Kozubek 2004].

2.2.2 Zastosowanie liposomów

Liposomy znalazły zastosowanie jako:

- model fazy lipidowej błony biologicznej [Mozafari 2005],
- nośniki różnych ważnych dla zdrowia substancji: leków, substancji aktywnych, substancji nawilżających, odżywczych czy witamin [Carafa i wsp. 1998, Massing i Fuxius 2000, Gaber 2004, Mozafari 2005].

Pęcherzyki lipidowe stosowane są jako model fazy lipidowej błony biologicznej służący do badań jej właściwości fizycznych w warunkach działania różnych czynników w tym procesów utleniania wywołanych induktorami fizykochemicznymi: AAPH [Tsuda i wsp. 1996, Arora i wsp. 1998, Paiva-Martins i wsp. 2003, Soto i wsp. 2003, Gabrielska i wsp. 2007], AMVN [Verstraeten i wsp. 2003], promieniowaniem

UV [Gabrielska i wsp. 2006], jonami żelaza [Aruoma i wsp. 1989, Arora i wsp. 1998, Gao i wsp. 2000, Gabrielska i wsp. 2007]. Prowadzone są badania także zmian płynności [Soto i wsp. 2002, Verstraeten i wsp. 2003, Gabrielska i wsp. 2006], oraz wielu procesów komórkowych w tym endocytozy, egzocytozy, fuzji komórek, a także procesów transportu [Gaber 2004].

W liposomach zamykane są substancje aktywne takie jak leki, zioła, witaminy i enzymy [Keller 2001]. Ratman i wsp. [2006] zbadali liposomy jako transportery związków niskocząsteczkowych, takich jak proteiny, peptydy, nukleotydy i plazmidy.

Po raz pierwszy liposomy będące nośnikami enzymów stworzyli Sessa i Weissmann w 1970 roku. Opisałi oni liposomy zawierające lizozym [Sessa i Weissmann 1970]. Przykładami innych enzymów zamykanych w liposomach są: alkaliczna fosfataza, amylaza, asparaginaza, chemotrypsyna, elastaza, β -galaktozydaza, pepsyna A, peroksydaza oraz proteinaza K. Liposomy zawierające enzymy znalazły zastosowanie w medycynie, przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym, jak i przemyśle spożywczym np. chymotrypsyna w procesach dojrzewania serów. Dzięki zastosowaniu pęcherzyków lipidowych cząsteczka enzymu chroniona jest przed destrukcyjnym działaniem środowiska [Walde i Ichikawa 2001]. Formułacje liposomowe mogą być aplikowane doustnie lub w formie iniekcji dożylnych, domięśniowych, podskórnych (zawiesiny wodne), w formie inhalacji (aerozole lub liofilizowane proszki), a także aplikowane na skórę jako kremy, emulsje, zawiesiny lub maści [Carafa i wsp. 1998, Keller 2001].

Liposomy będące nośnikami substancji aktywnych biologicznie powinny charakteryzować się:

- wysoką efektywnością zamykania [Saraf 2010],
- długoterminową stabilnością [Saraf 2010],
- dobrymi właściwościami uwalniania substancji, której są nośnikami [Mozafari 2005],
- biodegradowalnością, w tym możliwością fuzji z błonami komórek [Massing i Fuxius 2000, Yokoyama i wsp. 2002],
- brakiem toksyczności, specyfiką działania, wydłużonym czasem działania [Allen i Cullis 2004, Massing i Fuxius 2000], oraz ochroną zamkniętych substancji aktywnych przed degradacją [Massing i Fuxius 2000, Keller 2001, Mozafari 2005, Fang i Bhandari 2010],

- zwiększoną skutecznością przeciwutleniającą zamkniętej substancji [Muszyńska i wsp. 2009].

Zastosowanie liposomów jako nośników leków ma wiele zalet w tym między innymi:

- możliwość zwiększenia relatywnego stężenia leku w skórze przy podaniu mniejszych dawek, w porównaniu z aplikacją wolnego leku,
- możliwość uwalniania substancji w odpowiednich dawkach przez dłuższy okres czasu,
- zminimalizowanie ryzyka wystąpienia reakcji ubocznych organizmu, gdyż działa na komórki docelowe w miejscu jego uwolnienia [Bartosiewicz i Kozubek 2008].

Zainteresowanie efektywnym zamykaniem aktywnych biologicznie substancji w liposomach wciąż rośnie. Opisywane są próby kapsulacji proantocyjanidyn [Petrovic i wsp. 2004], cisplatyny [Hwang i wsp. 2007], katechin [Fang i wsp. 2006, Lee i wsp. 2008], substancji rozpuszczalnych w wodzie - leków: diklofenaku, ketoprofenu, ibuprofenu [Nii i Ishii 2005] oraz substancji rozpuszczalnych w lipidach, takich jak karotenoidy [Pintea i wsp. 2005]. Podejmowane są próby zamykania substancji, w celu poprawienia jej rozpuszczalności. Coimbra i wsp. [2011] wykazali, że dzięki zastosowaniu nośników liposomowych możliwe jest poprawienie rozpuszczalności oraz stabilności naturalnych składników aktywnych biologicznie, takich jak kwas kawowy, karwakrol, tymol oraz pterostilbeny. Przykładem zwiększenia stabilności związku w wyniku zamykania go w liposomach jest resweratrol [Kristol i wsp. 2009].

El-Samaligy i wsp. [2006] dla zwiększenia biodostępności sylimaryny, podjęli próby zamykania jej w liposomach REV utworzonych z fosfatydylocholiny sojowej z dodatkiem cholesterolu. Udało się im otrzymać nośniki liposomowe o wysokiej wydajności 69,22 %. Takahashi i wsp. [2009] zamykali w liposomach kurkuminę. Otrzymali oni 68 % wydajność zamykania, oraz zwiększone wchłanianie kurkuminy z przewodu pokarmowego w porównaniu z jej formą nieliposomową. Innymi związkami, nad których poprawą biodostępności trwają badania, są flawonoidy oraz inne związki bioaktywne. Zhong i wsp. [2005] opisali próby zamykania brewiskapiny w liposomach MLV utworzonych z fosfatydylocholiny uzyskując wydajność 87,9 %. Mignet i wsp. [2012] otrzymali wydajność 56 % zamykania fizetyny w wyniku nawadniania suchego filmu lipidowego roztworem tej substancji.

Fan i wsp [2007] zbadali wpływ zastosowanej metody do otrzymywania nośników salidrozydu izolowanego z różeńca górskiego (*Rhodiola rosea* L.) na efektywność jego zamykania. Autorzy tej pracy zastosowali 5 metod otrzymywania liposomów w tym m.in.: sonifikowania, odparowania odwróconych faz, a także zamrożeniowo-rozmrożeniową. Badania wykazały, że efektywność zamykania salidrozydu rośnie według następującej relacji: liposmy sonifikowane < REV < FAT. Dużą efektywność zamykania substancji w liposomach FAT sugerują również Fang i Bhandari [2010]. Sinico i wsp. [2005] wykazali natomiast, że liposomy MLV z HSPC z dodatkiem cholesterolu, o efektywności zamykania 74,15 %, otrzymane metodą nawadniania filmu, charakteryzują się wyższą efektywnością zamykania w porównaniu z liposomami SUV (65,90 %), otrzymanymi w wyniku sonifikowania. Fang i wsp. [2006] w badaniach zamykania katechiny, epikatechiny oraz EGCG w liposomach z fosfatydylocholinoi jajecznej wykazali, że dodatek 15 % etanolu do nawadniania filmu lipidowego powoduje wzrost efektywności zamykania katechiny. Wykazali oni również, że obecności cholesterolu w błonie liposomów zwiększa efektywność zamykania katechiny w ich wnętrzu.

Przemysł spożywczy

Liposomy są szeroko stosowane w przemyśle spożywczym, zarówno do badań zarówno jak i do procesów produkcyjnych. Zaletą pęcherzyków jest między innymi to, że utworzone są ze związków dopuszczonych do kontaktu z żywnością, jako podstawowych składników pożywienia, jakim jest np. lecytyna uzyskiwana z żółtek jaj oraz z ziarna soi [Lasic 1995]. Liposomy stosowane są w przemyśle spożywczym jako nośniki aromatów, substancji słodzących, barwników, konserwantów, przeciwutleniaczy oraz witamin. Zastosowanie liposomowych nośników umożliwia kontrolę nad uwalnianiem ich składników oraz ich biodostępnością [Gibbs i wsp. 1999]. Aktywne substancje zamknięte w pęcherzykach lipidowych są chronione przed niekorzystnymi warunkami fizyko-chemicznymi jak np. wilgotnością, temperaturą, utlenianiem, zmianami pH, przed skutkami działania enzymów podczas produkcji, warunkami przechowywania i dystrybucji, a także ochronie po spożyciu w środowisku przewodu pokarmowego [Chaudhry i Castle 2011, Felber i wsp. 2011]. Nośniki liposomowe posiadają wiele zalet, do których należą: zwiększona rozpuszczalność, większa biodostępność, zapewniona kontrola uwalnianych substancji zamykanych w liposomach. Dużą zaletą nośników liposomowych jest możliwość otrzymywanie ich

na dużą skalę przy użyciu naturalnych składników. Rao i wsp. [1995] opisali metody zamykania enzymu beta-galaktozydazy izolowanej z *Aspergillus flavus* w liposomach o różnym składzie lipidowym. Wykazali oni, że sposób przygotowania nośników ma wpływ zarówno na efektywność zamykania, jak i czas inaktywacji enzymu. Wydajność zamykania jaką otrzymali wynosiła 18,3 % (dla liposomów otrzymanych metodą DRV) i 27,6 % (dla liposomów otrzymanych metodą REV). Po dodaniu tak utworzonych liposomów do mleka zaobserwowano, że liposomy DRV zhydrolizowały 65 % laktozy, natomiast liposomy REV tylko 20 %. W ten sposób wykazali, że liposomy DRV wykazują lepszą ochronę laktozy przed beta-galaktozydazą, aniżeli liposomy REV. Całkowita aktywność enzymatyczna obu nośników w mleku, nie była zależna od zastosowanej metody otrzymywania liposomów – zarówno liposomy DRV, jak i REV trawiły do 50 % laktozy w mleku, w warunkach zbliżonych do warunków panujących w przewodzie pokarmowym [Rao i wsp. 1995].

Goennet i wsp. [2010] opisali wpływ zamykania lipofilnych witamin A, D, E, K oraz karotenoidów w liposomach na ich doustną oraz przezskórną aplikację. Zasugerowano, że mogą one zostać zastosowane w przemyśle spożywczym dla wzbogacenia żywności w te witaminy, a także w przemyśle farmaceutycznym oraz kosmetycznym. Marsanasco i wsp. [2011] wykazali możliwość zastosowania pęcherzyków lipidowych jako nośników witamin E i C. Ponadto, ich wyniki potwierdziły teorię, że formułacje liposomowe są bardzo przydatne w ochronie witamin, oraz utrzymaniu ich aktywności w wodnych formach żywności, szczególnie w przypadku termicznie niestabilnej witaminy C. Liposomowe preparaty proponowane w tej pracy, wykazały działanie ochronne nawet w warunkach pasteryzacji.

Malheiros i wsp. [2010a i 2010b] omówili liposomy zawierające zamkniętą w ich wnętrzu nizinę jako bakteriocynę. Nizyna produkowana jest przez szczepy bakterii *Lactococcus lactis* i wywiera swą antydrobnoustrojową aktywność na liczne bakterie gram-dodatnie. Nie wykazuje natomiast właściwości antybiotycznych wobec bakterii gram-ujemnych, drożdży czy grzybów. Nizyna chociaż jest antybiotykiem, nie jest stosowana w przemyśle farmaceutycznym jako lek. W przemyśle spożywczym zaś stosowana jest jako konserwujący dodatek do żywności (E234), zapobiegający rozwojowi drobnoustrojów, przez co psuciu się żywności. Nizyna stosowana jest przy produkcji serów (zapobiega fermentacji masłowej), w konserwach warzywnych i owocowych, w przemyśle mięsnym obniża potrzebę stosowania azotanów oraz przedłuża okres przydatności mleka do spożycia w krajach o gorącym klimacie.

Bakteriocyna ta jest odporna na wysoką temperaturę i niskie pH. Malheiros i wsp. [2010b] wykazali wyższą aktywność nizyny, zamykanej w liposomach w porównaniu z jej wolną formą, hamującą wzrost najbardziej zjadliwych patogenów, przenoszonych przez żywność, do których należą *Listeria monocytogenes*. Zamykanie peptydów o właściwościach przeciwbakteryjnych w liposomach stanowi alternatywę wobec konserwantów, stosowanych w ochronie żywności, które zapobiegają rozwojowi niepożądaney flory bakteryjnej i wydłużających jej przydatność do spożycia [Laridi i wsp. 2003, Were i wsp. 2003, Teixeira i wsp. 2008]. Pęcherzykowe nośniki znalazły także zastosowanie w produkcji sera. Lasic [1995] zasugerował, że zastosowanie proteinaz zamykanych w liposomach skraca czas dojrzewania serów od 30 do 50 %. Takie skrócenie dojrzewania serów przynosi znaczne korzyści finansowe, np. podczas produkcji długo dojrzewających serów, takich jak np. Cheddar, związane z krótszym czasem ich leżakowania w specjalnych warunkach. W wyniku enzymatycznej lipolizy tłuszczów zawartych w mleku do kwasów tłuszczowych, które są prekursorami metyloketonów, drugorzędowych alkoholi i estrów, ser Cheddar zyskuje właściwy smak, zapach i konsystencję. Zastosowanie liposomów zapewnia optymalne rozproszenie enzymów, co z kolei ma wpływ na właściwości sensoryczne sera. Autorzy prac [Kheadr i wsp. 2003] wykazali, że zastosowanie pęcherzyków lipidowych zawierających lipazy (preparat Palatase M firmy Novozymes), pozwala skrócić czas dojrzewania sera do 90 dni. Liposomowy preparat utrzymuje równowagę pomiędzy ilością kazeiny, a produktami hydrolizy tłuszczów mleka w wyniku czego uzyskany ser nie ma gorzkiego, zjełczałego smaku.

Liposomy zastosowano do przyspieszenia dojrzewania sera również z następujących powodów:

- dodanie wolnej proteinazy do mleka używanego w produkcji twarogów wykazuje niski wskaźnik retencji enzymu,
- pęcherzyki fosfolipidowe mogą chronić substraty, a w związku z tym pozwalają uniknąć strat, które wynikają z bezpośredniego dodawania egzogennej proteinazy do mleka,
- liposomy o rozmiarach zbliżonych do komórek bakteryjnych mogą zostać rozproszone w podobnym do nich stopniu [Piard i wsp. 1986].

Przemysł kosmetyczny

Liposomy znalazły zastosowanie w preparatach do pielęgnacji skóry jako formułacje zabezpieczające substancję czynną przed destrukcyjnym wpływem czynników zewnętrznych oraz ze względu na nawilżające skórę właściwości. Pęcherzyki lipidowe stosowane są zarówno w kosmetologii i dermatologii, jak i do transdermalnego aplikowania leków. W kosmetyce znalazły zastosowanie tzw. puste liposomy, czyli niezawierające aktywnych substancji. Mogą one uzupełniać lipidy w skórze, w szczególności poprzez dostarczenie do niej kwasu linolowego, korzystnie wpływającego na jej elastyczność [Lasic 1995]. Użycie pustych liposomów, w dermatologii podczas leczenia chorób skóry, ma na celu jej przygotowanie do podania leku. Przygotowanie skóry polega na rozluźnieniu gęsto zawartych w niej lipidów, a przez to ułatwieniu transportu leku, który jest w postaci roztworu wodnego. W zależności od składu lipidowego pęcherzyki mają możliwość penetracji skóry, przekazując substancję czynną do miejsca docelowego, w którym dochodzi do jej uwolnienia. Jednym z miejsc podawania preparatów liposomowych jest naskórek. Odpowiednio dobrany skład lipidowy liposomów umożliwia odpowiednią interakcję pęcherzyków ze skórą. Rozróżnia się trzy mechanizmy oddziaływania liposomów ze skórą. Należą do nich: adsorpcja aktywnej substancji oraz lipidów na powierzchni naskórka, penetracja substancji zamkniętej w liposomach oraz lipidów przez warstwę rogową, oraz przenikanie aktywnej substancji do żywych partii skóry lub nawet do naczyń krwionośnych. Zastosowanie liposomów jako nośników leku poprzez naskórek ma wiele zalet. Ułatwia penetrację leku w najbardziej zewnętrznych warstwach naskórka (często również głębiej), dzięki naturalnemu powinowactwu liposomów do jego składników. Adsorpcja umożliwia ochronę skóry przed szkodliwym działaniem wolnych rodników. Degradowane pęcherzyki lipidowe tworzą na powierzchni skóry film lipidowy, dodatkowo nawilżają skórę zapobiegając utracie przez nią wody [Keller 2001].

Po raz pierwszy w kosmetyce pęcherzyki lipidowe zastosował Dior w 1987 roku wprowadzając krem Capture[®] zawierający liposomy. Od tego czasu liczba produktów kosmetycznych zawierających pęcherzyki lipidowe wciąż wzrasta. Są to zarówno gotowe preparaty liposomowe, które są stosowane jako zamienniki kremów, żeli i maści, jak i preparaty zwane „do-it-yourself”, zawierające substancje nawilżające, antybiotyki, oraz rekombinowane białka stosowane podczas gojenia ran czy

w oparzeniach słonecznych. Większość kosmetyków zawierających liposomy to preparaty przeciwstarzeniowe „anti-aging” kremy do skóry, wodoodporne filtry przeciwsłoneczne, perfumy o przedłużonej trwałości zapachu, odżywki do włosów, a także:

- preparaty pielęgnacyjne: Future Perfect Skin Gel (Ester Lauder), Symphatic 2000 (Biopharm GmbH), Natipide (Nattermann PL), Eye Perfectom (Avon), Farmix, krem bioaktywny z liposomami i witaminami A+E (Farmie), Lavera (Lavera), Lirene Anti-Aging (Lirene), Heliabrine-HP krem liposomowy (Heliabrine), seria Doskonała Skóra (Miraculum), żel nawilżający (Eubiona) [Lasic 1995],
- preparaty samoopalające zawierające tyrozynę lub dihydroksyaceton (DHA), np. Auto-Bronzant (Guinot). Zamknięcie tych substancji w liposomach zniwelowało przykry zapach oraz możliwość pozostawienia plam na ubraniach po aplikacji samoopalacza,
- środki pielęgnacyjne po goleniu, np. seria Intesa (Intesa), LAKSHMI,
- balsamy do włosów, np. LAKSHMI,
- płyny do twarzy, np. Lavera (Lavera),
- olejki usuwające rozstępny,
- olejki do kapeli, np. LAKSHMI, Marena [Bartosiewicz i Kozubek 2008].

Najczęściej przenoszone za pomocą nośników lipidowych substancje biologicznie czynne to:

- proteiny (kolagen, elastyna),
- witaminy: A, B, C, E,
- ekstrakty roślinne,
- roślinne komórki macierzyste,
- środki powodujące opalanie (DHA, tyrozyna),
- koenzym Q10,
- kwas hialuronowy,
- alantoina, kofeina, karnityna, pantenol, glutation, heparyna, wyciąg z płodu [http://bez-recepty.pgf.com.pl].

Lee i Tsai [2010] wykazali, że aplikacja koenzymu Q10 w formulacji liposomowej z fosfatydylocholinoj sojowej, wyraźnie zwiększa jego biodostępność w porównaniu z formą nieliposomową.

Oprócz naturalnych lipidów, stosowanych do formowania liposomów, stosowane są także jako nośniki aktywnych substancji liposomy utworzone z niejonowych surfaktantów lub ze sfingolipidów. Pęcherzyki uformowane z niejonowych surfaktantów nazywa się niosomami [Uchegbu i Vyas 1998]. Sfingosomy zbudowane są z sfingolipidów, które są identycznych z ceramidami występującymi w naskórku, przez co mogą go regenerować. Pierwszy preparat kosmetyczny zawierającym niosomy został wyprodukowany przez był przez L'Oréal (Niosomes®).

Aktywne substancje zawarte w kosmetykach powinny wnikać umiarkowanie głęboko w skórę, aby wywołany efekt był efektem kosmetycznym, a nie farmaceutycznym [Müller i wsp. 2002]. Na efektywność pęcherzyków lipidowych, jako nośników, wpływ ma w szczególności faza w jakiej znajdują się lipidy tworzące liposom, oraz ich rozmiar i liczba warstw. W głębsze warstwy skóry mogą przeniknąć liposomy, których lipidy są w fazie ciekłokrystalicznej. Pęcherzyki lipidowe utworzone z lipidów będących w fazie żelu nie wnikają nawet do warstwy rogowej naskórka [Yarosh 2001, Honeywell-Nguyen i Bouwstra 2005]. Na właściwości aplikacyjne liposomów wpływ ma także rodzaj zastosowanego lipidu. Betz i wsp. [2005] wykazali, że pęcherzyki lipidowe uformowane z fosfolipidów jajecznych, w wyższym stopniu nawilżały skórę (u 10 ochotników w wieku od 24 do 32 lat), aniżeli liposomy formowane z fosfolipidów sojowych.

Aplikowanie w głąb skóry aktywnych substancji zamykanych w liposomach jest możliwe wtedy, gdy istnieje podobieństwo składu lipidowego pęcherzyków ze składem lipidów w naturalnych błonach. W takim wypadku mogą one ulegać fuzji z komórką i wprowadzać w głąb skóry aktywne substancje, w tym leki na schorzenia dermatologiczne. Trwają badania nad modyfikacjami pęcherzyków lipidowych prowadzące do powstania elastycznych, pęcherzyków odkształcalnych, które mają lepsze możliwości wnikania oraz podawania leku w stosunku do konwencjonalnych liposomów [Manconi i wsp. 2011]. Powstają innowacyjne struktury zwane etnosomami (ang. *ethnosomes*), które ułatwiają wprowadzenie aktywnej substancji poprzez zawartość etanolu w odpowiednim stężeniu oraz wody, która zwiększa elastyczność błon [Touitou i wsp. 2000]. Moussaoui i wsp. [2002] opisali struktury zwane *Marinosomami*® - liposomy utworzone z lipidów pochodzących z błon organizmów wodnych, zawierające dodatkowo 56 % wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. *polyunsaturated fatty acid* - PUFA) w tym kwas eikozapentaenowy (EPA) (20:5n-3) i kwas dokozaheksaenowy (DHA) (22:6n-3). Kwasy te nie są obecne

w naskórku, ale są metabolizowane przez jego enzymy do przeciwzapalnych i antyproliferacyjnych metabolitów przez co korzystnie wpływają na stany zapalne skóry [Moussaoui i wsp. 2002].

Cevc i wsp. [1998] jako pierwsi opisali tzw. transferosomy (zawierające fosfolipidy oraz cholan sodu), służące do nieinwazyjnego dostarczenia insuliny. Transferosomy pokonują bariery przepuszczalności takie jak np. nieuszkodzoną skórę. Zastosowanie przez Cevc i wsp. [1998] surfaktantu miało na celu obniżenie napięcia powierzchniowego błony liposomów, co spowodowało jej destabilizację. Efektywność dostarczania aktywnej substancji przy pomocy transferosomów jest porównywalna z aplikacją jej przez iniekcję. Potwierdziły to badania *in vivo* na myszach i ludziach, z liposomami zawierającymi zamykaną insulinę, w wyniku gradientu wody między warstwą rogową naskórka, a otaczającą atmosferą [Cevc i wsp. 1998].

Srisuk i wsp. [2012] opisali zastosowanie liposomów, zawierających fosfatydylocholinę sojową, cholesterol i kwas oleinowy, jako nośników Metotrexat-u w leczeniu łuszczycy. Autorzy pracy wykazali korzystny wpływ takiej aplikacji, związany z obniżeniem skutków ubocznych tego leku, w porównaniu z przyjmowaniem go doustnie lub dojelitowo. Przykładami innych leków podawanych do organizmu poprzez aplikację transdermalną są: cyklosporyna A, diklofenak, heparyna, retinol oraz melatonina [Betz i wsp. 2005, Elsayed i wsp. 2007].

Przemysł farmaceutyczny

Pionierem zastosowania liposomów w medycynie był Lasic [Lasic 2001]. Liposomy stosowane są w farmakologii i medycynie zarówno w celach terapeutycznych, jak i diagnostycznych. Zastosowanie pęcherzyków lipidowych jako nośników aktywnych substancji wykorzystywanych także w terapii schorzeń skóry opisano w rozdziale o zastosowaniu liposomów w przemyśle kosmetycznym.

Pęcherzyki lipidowe jako system podawania leku ma wiele zalet w porównaniu z konwencjonalnymi metodami aplikowania leków. Preparaty liposomowe wykazują inną biodystrybucję i farmakokinetykę aktywnej substancji w porównaniu z jej wolną formą.

Zastosowanie liposomów w celu dostarczania leków zapewnia:

- utrzymanie właściwego stężenia leku przez stosunkowo długi czas, poprzez powolne i jednostajne uwalnianie substancji aktywnej,
- ochronę substancji aktywnej przed działaniem enzymów,

- zwiększenie rozpuszczalności leków lipofilowych oraz amfifilowych,
- pasywne wnikanie do komórek układu odpornościowego,
- ukierunkowane działanie, zapobiegające gromadzeniu leku w sercu, nerkach, mózgu i układzie nerwowym, zmniejsza to sercowo-, nefro- oraz neurotoksyczność,
- lepszy transfer hydrofilowych i naładowanych cząsteczek,
- zmniejszenie liczby dawek leku,
- lepszą penetrację aktywnej substancji do tkanek, zwłaszcza w przypadku stosowania liposomowej formy dawkowania przez skórę.

Pęcherzyki lipidowe mają zastosowanie terapeutyczne głównie w dwóch kategoriach chorób: ciężkich, infekcjach grzybiczych oraz w chorobach nowotworowych [Drulis-Kawa i Dorotkiewicz-Jach 2010]. Przykładem znanych leków liposomowych są: zawierające antybiotyki antracyklinowe: doksorubicynę (Doxil) oraz daunorubicynę (Dauno-Xome), stosowane w leczeniu mięsaka Kaposi'ego oraz zawierające amfoterycynę B (AmBiosome, Abelcet i Amphocil), stosowane przy ciężkich infekcjach grzybiczych [Kozubek i wsp. 2000, Massing i Fuxius 2000, Lindner i wsp. 2008]. Zastosowanie pęcherzyków lipidowych zmniejsza neurotoksyczność amfoterycyny B oraz kardiotoxyczność doksorubicyny wobec zdrowych tkanek. Caelyx[®] to preparat liposomowy zawierający chlorowodorek doksorubicyny zamknięty w liposomach, których powierzchnia pokryta jest metoksypolietylenoglikolem (MPEG). Preparat ten stosowany jest w monoterapii raka piersi z przerzutami u pacjentów ze zwiększonym ryzykiem powikłań ze strony mięśnia sercowego, w leczeniu zaawansowanego raka jajnika, oraz w leczeniu mięsaka Kaposiego. Kolejnym preparatem zawierającym doksorubicynę liposomalną jest Myocet[®]. Jest to kompleks doksorubicyny z cytrynianem sodu [<http://www.ema.europa.eu>].

Naukowcy podejmują temat stworzenia nośników liposomowych synergistycznie działających substancji np. antybiotyków: gentamycyny oraz ceftazydiminy [Schiffelers i wsp. 2001]. Cosco i wsp. [2012] podjęli próby stworzenia nośnika liposomowego zawierającego dwie działające synergicznie substancje aktywne, w leczeniu raka sutka: gemcytabiny oraz tamoksifenu. Wykazano, że zamknięcie gemcytabiny w PEG-yłowanych liposomach pozwala na 10-krotne zmniejszenie

efektywnej dawki, w odniesieniu do komercyjnego nieliposomowego preparatu zawierającego gemcyabinę (Gemzar®) [Cosco i wsp. 2011].

Obecnie w Polsce dopuszczona jest forma liposomalna cytarabiny (Ara-C) - DepoCyte [Plecka 2010]. DepoCyte stosowany jest w chłoniakowatym zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych, oraz w powikłaniu choroby nowotworowej.

Pęcherzyki lipidowe, jako formy nośnikowe, stosowane są również w szczepionkach przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu A oraz przeciwko grypie. Liposomalna morfina stosowana jest w uśmierzaniu bólu u chorych na raka. Werteporfina liposomowa stosowana jest natomiast jako fotouczulacz w terapii fotodynamicznej zwyrodnienia plamki żółtej. Aktywacji werteporfiny przy pomocy lasera stymuluje tworzenie zakrzepu zamykającego naświetlane naczynia. Terapia fotodynamiczna (ang. photodynamic therapy – PDT) jest metodą leczenia polegającą na reakcji fototoksycznej, do której dochodzi w wyniku oddziaływania substancji fotouczulającej i światła o odpowiedniej dla danej substancji długości fali. Reakcja zachodzi jedynie w obecności fotouczulacza. Substancja ta charakteryzuje się zdolnością do pochłaniania kwantów energii świetlnej, co powoduje jej przejście w stan wzbudzenia, a następnie powrót do stanu podstawowego z wypromieniowaniem porcji energii o odpowiedniej długości fali. PDT stosowana jest w diagnozowaniu nowotworów. Umożliwia zobrazowanie świecących komórek nowotworowych, skupionych nawet w bardzo małych ogniskach, które wchłonęły preparat i uczuliły się na światło, a także pozwala precyzyjnie określić granicę nowotworu. Ponowne naświetlanie nowotworów promieniowaniem o wyższej energii powoduje emisję porcji energii która uruchamia kaskadę procesów powodujących efekt fitotoksyczny (dochodzi do powstania reaktywnych form tlenu). Uwalnianie RFT uszkodzają komórki nowotworowe powodując ich śmierć [<http://whoguideline.blogspot.com>].

Behera i wsp. [2011] opisali metodę leczenia erytrodermatozy (wrzodowej choroby skóry) powodowanej przez bakterie *Aeromonas hydrophilia* z zastosowaniem PEG-liposomów zawierających zamykane wewnątrz antygeny. Wykazali również, że PEG-liposomy przez dłuższy czas cyrkulują w organizmie i efektywniej uwalniają aktywne substancje [Behera i wsp 2011]. Modyfikacje przedłużające czas działania liposomów i zapobiegające wychwytywaniu ich przez układ fagocytów jednojądrzastych (MPS), powoduje, że lek dłużej znajduje się w krwiobiegu.

Technologia liposomowa umożliwia otrzymanie różnych liposomowych form leków zawierających np. antybiotyki [Drulis-Kawa i Dorotkiewicz-Jach 2010],

nystatyny (Nyotran[®]), wankomycyny [Nicolosi i wsp. 2010], leki przeciwwirusowe zawierające kardiolipinę stosowaną w terapii HIV [Malavia i wsp. 2011], niesteroidowe leki przeciwzapalne - diklofenak [Jukanti i wsp. 2011], insulinę [Degim i wsp. 2004, Mady i Elshemey 2011], pochodne cytydyny - cydofowir [Ruozzi i wsp. 2010] oraz wiele innych.

Goldberg i Klein [2012] zasugerowali zastosowanie liposomów SUV uformowanych z HSPC do smarowania stawów ssaków, w celu poprawienie ich sprawności.

W terapii genowej stosowane są kationowe liposomy [Zheng i wsp. 2009]. Preparatami liposomowymi stosowanymi w leczeniu polegającym na wprowadzeniu obcych kwasów nukleinowych (DNA lub RNA) do komórek zajmują się m.in. następujące firmy: Vical (San Diego, CA, USA), Genzyme (Farmington, MA, USA), GeneMedicine (The Woodlands, TX, USA), Megabios (Burlingame, CA, USA) [Lasic 1998]

Medycyna posługuje się także pęcherzykami lipidowymi do znakowania tkanek, komórek oraz elementów wewnątrzkomórkowych, jak np. mitochondria. Przy pomocy rezonansu oznaczane są środki kontrastowe, które z kolei ukazują poszczególne cząsteczki, informując, gdzie w danej komórce, w jakim obszarze następuje ekspresja wybranych białek [<http://www.przegląd-urologiczny.pl>].

Liposomy immunoenzymatyczne stosowane są np. do szybkiej identyfikacji grupy paciorkowców bezpośrednio z wymazu z gardła. Technologia ta może być stosowana w celu ułatwienia szybkiego rozpoznania paciorkowego zapalenia gardła [Gerber i wsp. 1990].

Zastosowanie pęcherzyków lipidowych w diagnostyce medycznej obejmuje liposomy z paramagnetykami, które wykazują powinowactwo do siateczki endoplazmatycznej i stosowane jako środki kontrastowe w metodzie rezonansu magnetycznego [Torchilin 1996].

W medycynie stosowane są także liposomy zawierające zamkniętą wewnątrz lucyferynę. W wyniku bioluminescencji możliwe jest obserwowanie dystrybucji leków w organizmie oraz ich dotarcie do konkretnych tkanek w odpowiednim czasie [Kheirulomoon i wsp. 2009].

2.3 Procesy utleniania lipidów

2.3.1 Wolne rodniki

W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie działaniem wolnych rodników zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Wolne rodniki to reaktywne molekuły posiadające jeden lub więcej niesparowanych elektronów na swojej powłoce walencyjnej [Boots i wsp. 2008]. Obecność niesparowanego elektronu (lub elektronów) powoduje, że są to wysoce reaktywne cząsteczki dlatego okres ich półtrwania jest bardzo krótki, wynosi około 10^{-6} s. Wolne rodniki mogą pełnić zarówno rolę utleniania jak i reduktora, ze względu na możliwość przyjmowania elektronu od innej cząsteczki lub oddawania nadmiarowego elektronu [Young i Woodside 2001, Ratman i wsp. 2006]. Niesparowany elektron w cząsteczkach wolnych rodników odpowiada za ich właściwości paramagnetyczne [Young i Woodside 2001].

W organizmach oddychających aerobowo tlen cząsteczkowy reaguje ze związkami organicznymi i utlenia je, pobierając od nich elektrony, czyli sam ulega redukcji. Całkowita redukcja cząsteczki tlenu zachodzi gdy przyłączy ona cztery elektrony i cztery protony. W wyniku całkowitej redukcji cząsteczki tlenu powstają dwie cząsteczki wody. Małe ilości tlenu, ok. 1-3%, ulegają niepełnej redukcji, co skutkuje powstawaniem wolnych rodników lub innych reaktywnych form. Powstają częściowo zredukowane formy tlenu, zwane reaktywnymi formami tlenu - RFT (ang. reactive oxygen species – ROS), podobnie powstają w sposób ciągły reaktywne formy azotu – RFA (ang. reactive nitrogen species - RNS) [Boots i wsp. 2008].

Wśród reaktywnych form tlenu oraz reaktywnych form azotu rozróżniane są związki o charakterze rodnikowym takie jak: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy ($OH^{\cdot}$), rodnik alkoksylowy ($RO^{\cdot}$), alkilowy rodnik nadtlenkowy ($ROO^{\cdot}$), tlenek azotu ($NO^{\cdot}$) i ditlenek azotu ($NO_2^{\cdot}$) oraz o charakterze nierodnikowym, takie jak tlen singletowy (1O_2), ozon (O_3), kwas podchlorawy ($HOCl$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), kation nitrozoniowy (NO^+), anion nitroksylowy (NO^-) oraz nadtlenoazotyn ($ONOO^-$) [Boots i wsp. 2008]. Tlenek azotu ($NO^{\cdot}$) oprócz charakteru rodnikowego pełni wiele ważnych funkcji fizjologicznych, m.in. reguluje ciśnienie tętnicze, hamuje agregację płytek krwi oraz pełni rolę neuromodulatora i neuroprzekaźnika w układzie nerwowym [Grajek 2007].

RFT i RFA różnią się reaktywnością, np. H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ i $NO^{\cdot}$ reagują *in vivo* tylko z niektórymi molekułami. Najbardziej aktywnym ze wszystkich ROS jest rodnik

hydoksyłowy, który może reagować z każdą molekułą [Boots i wsp. 2008]. OH[•] może reagować z cząsteczką wypierając atom wodoru – utleniania je lub poprzez addycje do wiązań podwójnych, np. addycja rodnika do podwójnego wiązania kwasu oleinowego [Bartosz 2006]. Rodnik hydroksylowy może zainicjować autooksydację, polimeryzację lub fragmentację kwasu tłuszczowego [Karawita i wsp. 2005, Boots i wsp. 2008, Hernández i wsp. 2009]. Nie ma on zdolności przenikania przez błony komórkowe [Rutkowski i wsp. 2007].

RFT i RFA wykazują dużą zdolność do reagowania z innymi molekułami w organizmie takimi jak białka, lipidy czy lipoproteiny [Karawita i wsp. 2005], w wyniku czego mogą je np. utleniać [Heim i wsp. 2002]. RFT reagują niespecyficznie z biomolekułami powodując w konsekwencji uszkodzenia struktur komórkowych [Małolepsza i Urbanek 2000]. RFT i RFA prowadzą do zmian DNA, RNA, zmniejszają aktywność enzymów, powodują wzrost przepuszczalności błony komórkowej, zaburzają sygnały w komórkach oraz indukują apoptozę, prowadzącą do śmierci komórki [Boots i wsp. 2008].

2.3.2 Powstawanie wolnych rodników

Wolne rodniki powstają endogennie w warunkach fizjologicznych w wyniku tlenowego oddychania, reakcji katalizowanych przez oksydazy, jony metali przejściowych oraz są produkowane przez aktywowane fagocyty, mitochondrialny i mikrosomalny łańcuch oddechowy [Rutkowski i wsp. 2007]. Do egzogennych źródeł wolnych rodników należą między innymi: dym tytoniowy, zanieczyszczenia powietrza, rozpuszczalniki organiczne, ksenobiotyki [Karawita i wsp. 2005, Boots i wsp. 2008], a także:

- radioliza - przemiany chemiczne związków na skutek działania promieniowania jonizującego w wyniku którego następuje rozpad cząsteczek wody,
- fotoliza - przerwanie wiązań kowalencyjnych na skutek absorpcji promieniowania elektromagnetycznego,
- sonoliza - działanie na roztwory wodne ultradźwiękami,
- jednoelektronowe reakcje redoks,
- homoliza - rozpad cząsteczek inicjatorów, zawierających słabe wiązania, które mogą ulec rozpadowi homolitycznemu, w wyniku którego z dwóch elektronów zaangażowanych w utworzenie tego wiązania

powstają fragmenty cząsteczki, które otrzymują po jednym elektronie, według reakcji: $A-B \rightarrow A^\cdot + B^\cdot$.

Homoliza nie ma znaczenia jako fizjologiczne źródło wolnych rodników, ma jednak znaczenie w pracach laboratoryjnych jako ich kontrolowane źródło. Związkami stosowanymi w pracach doświadczalnych, które w temperaturze fizjologicznej ulegają homolitycznemu rozpadowi są: rozpuszczalny w wodzie związek 2,2'-azo-bis(2-amidynopropan) (AAPH) (rys. 17a) oraz rozpuszczalny w tłuszczach 2,2'-azo-bis(2,4-dimetylowaleronitryl) (AMVN) (rys. 17b). Rozpad homolityczny w/w związków tworzy rodniki alkilowe $R^\cdot$, które w obecności tlenu indukują rodniki nadtlenkowe $ROO^\cdot$ [Bartosz 2006].

Źródłem powstawania wolnych rodników są także reakcje enzymatyczne zachodzące w organizmie. Do enzymów wytwarzających wolne rodniki należą oksydazy: aldehydowa, D-aminokwasowa, ksantynowa, galaktozowa [Bartosz 2006] oraz oksydaza NADPH, obecna w błonie fagocytów [Rutkowski i wsp. 2007]. Inne enzymy tworzące wolne rodniki to: reduktaza cytochromu P-40, reduktaza glutationowa, peroksydaza oraz tyrozynaza [Bartosz 2006]. Synteza tlenu azotu następuje także przy udziale rodziny enzymów – syntetaz tlenu azotu (NOS). Obecnie wyróżnia się trzy rodzaje syntetaz NO [Rutkowski i wsp. 2007]: neuronalna (nNOS), indukowana (iNOS) i śródbłonkowa - endotelialna (eNOS) [Grajek 2007].

Biologiczne znaczenie wolnych rodników

Wolne rodniki są ciągle obecne w organizmie i są integralną częścią fizjologii żywego organizmu [Wong i wsp. 2006a]. W sytuacji gdy zostanie zachwiana równowaga pomiędzy ich ilością (produkowanymi przez organizm oraz dostarczanych ze środowiska), a systemem ich defensywy, dochodzi do szybkiego wzrostu RFT zwanego stresem oksydacyjnym, co prowadzi do licznych chorób, a nawet śmierci [Wong i wsp. 2006b, Katalinic i wsp. 2006]. W wyniku stresu oksydacyjnego dochodzi do zmiany struktury i funkcji enzymów, czynników transkrypcyjnych, białek cytoszkieletu komórki oraz utleniania zasad DNA [Rutkowski i wsp. 2007]. Utleniania lipoprotein o niskiej gęstości przez wolne rodniki powoduje miażdżycę, chorobę wieńcową oraz inne choroby układu krwionośnego. Wolne rodniki przyczyniają się między innymi do powstawania nowotworów [Wong i wsp. 2006a], zwyrodnienia stawów, dny moczanowej, cukrzycy, chorób układu nerwowego tzw.

neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, choroby Parkinsona, a także przyspieszają procesy starzenia się organizmu [Heim i wsp. 2002, Karaita i wsp. 2005, Ratman i wsp. 2006]. Denham Harman, po raz pierwszy w połowie 1950 roku, zaproponował, że za procesy starzenia odpowiadają wolne rodniki [Harman 1956]. Reaktywne formy tlenu odgrywają znaczącą rolę w rozwoju zapalenia żołądka spowodowanego przez *Helicobacter pylori*, marskości wątroby, a także w patomechaniźmie astmy oskrzelowej [Rutkowski i wsp. 2007]. RFT uszkadzają reszty sacharydowe białek lub cukrowce, np. mukopolisacharyd - kwas hialuronowy, będący istotnym składnikiem mazi stawowej. W wyniku rozerwania wiązań glikozydowych pomiędzy monomerami następuje depolimeryzacja tego wielocukru, co prowadzi do zmniejszenia lepkości roztworu kwasu i uniemożliwia prawidłowe funkcjonowanie stawów [Puzanowska-Tarasiewicz i wsp. 2008].

2.3.3 Procesy utleniania błon biologicznych i czynniki indukujące ten proces

Peroksydacja lipidów uważana jest za najbardziej znany biologiczny łańcuchowy proces wolnorodnikowy. Polega na tworzeniu nadtlenków lipidów. Nazwa pochodzi od angielskiego słowa peroxidation. Wolne rodniki atakują wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. polyunsaturated fatty acid – PUFA) obecne np. w błonach komórki. Większa liczba wiązań podwójnych w cząsteczce wielonienasyconego kwasu tłuszczowego zwiększa podatność na procesy peroksydacji [Puzanowska-Tarasiewicz i wsp. 2008]. Proces utleniania lipidów w błonach biologicznych, poddanych utlenianiu w wyniku czynników stresowych, uznano za jeden z głównych mechanizmów uszkodzenia komórek organizmów tlenowych [Tang i wsp. 2000]. Peroksydacja lipidów składa się z trzech faz charakterystycznych dla reakcji wolnorodnikowych: inicjacji, propagacji oraz termianacji. Inicjacja polega na oderwaniu atomu wodoru od cząsteczki wielonienasyconego kwasu tłuszczowego i utworzeniu rodnika alkilowego (1), który w miejscu gdzie znajdował się oderwany atom wodoru posiada niesparowany elektron. Zachodzi przegrupowanie wiązań podwójnych w łańcuchu, co prowadzi do powstania wiązań sprzężonych. Naturalnie występujące kwasy tłuszczowe nie posiadają wiązań sprzężonych, obecność ich w łańcuchu kwasów tłuszczowych jest znakiem przebiegu procesu peroksydacji [Bartosz 2006]. Do czynników odrywających atom wodoru od wielonienasyconego kwasu tłuszczowego, przez co inicjujących proces peroksydacji lipidów, należą: rodnik hydroksylowy, rodnik nadtlenkowy $\text{LOO}^\bullet$, alkoksylowy $\text{LO}^\bullet$, alkilowy $\text{L}^\bullet$, ozon, NO , NO_2 , SO_2 , kationorodniki – ferrytowy oraz nadferrytowy

[Puzanowska-Tarasiewicz i wsp. 2008]. W 1964 roku Hochstein i wsp. wykazali, że jednym ze sposobów inicjowania peroksydacji lipidów jest obecność żelaza w środowisku reakcji [Hochstein i wsp. 1964]. Mechanizm powodujący utleniania lipidów zależny od żelaza badano w modelowych systemach *in vitro*, takich jak liposomy [Aruoma i wsp. 1989, Gao i wsp. 2000] oraz mikrosomy [Aruoma i wsp. 1989]. Peroksydację mikrosomów inicjowano dodatkiem Fe^{3+} z NADPH [Aruoma i wsp. 1989, Tang i wsp. 2000]. W przypadku liposomów dodawano jony żelaza np. Fe^{2+} (często w formie schelatowanej w kompleks np. ADP-Fe^{2+}) albo Fe^{3+} z czynnikiem redukującym np. kwasem askorbinowym (rys. 18) [Aruoma i wsp. 1989, Gao i wsp. 2000, Tang i wsp. 2000].

W środowisku reakcji jony Fe^{2+} utleniają się do formy Fe^{3+} . Askorbinian regeneruje powstałą formę jonów żelaza do formy Fe^{2+} . Zapewnia w ten sposób właściwy stosunek obu form żelaza, tj. 1:1, optymalny do zajścia reakcji utleniania lipidów [Aruoma i wsp. 1989].

Kolejnym etapem peroksydacji lipidów jest prolongacja. Polega ona na tym, że to wolne rodniki alkilowe $\text{L}^\cdot$ reagują z tlenem tworząc rodniki nadtlenkowe $\text{LOO}^\cdot$ (2). Powstałe rodniki nadtlenkowe lipidów odrywają atom wodoru od „zdrowej” cząsteczki kwasu tłuszczowego LH , w wyniku czego powstaje nadtlenek kwasu tłuszczowego LOOH (3) i kolejny rodnik alkilowy, który wciąga do reakcji kolejne „zdrowe” cząsteczki kwasów tłuszczowych. Reakcja prolongacji może zachodzić wielokrotnie aż do momentu kiedy nastąpi terminacja, oddziaływanie między dwoma rodnikami dające jako produkt cząsteczkę o charakterze nierodnikowym. Reakcja termiancji może zachodzić pomiędzy dwoma wolnymi rodnikami alkilowymi (4), dwoma rodnikami nadtlenkowymi (5), dwoma różnymi rodnikami (6).



[Bartosz 2006].

Reakcję peroksydacji może komplikować proces zwany reinicjacją, polegający na tym, że nierodnikowe produkty peroksydacji, takie jak nadttlenki lipidów (LOOH) rozkładają się do produktów wolnorodnikowych. Zjawisko to inicjowane jest przez jony metali przejściowych, np. żelazo [Bartosz 2006].

Dalsze przemiany produktów peroksydacji, zachodzące w wyniku reakcji β -eliminacji prowadzą do rozpadu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i utworzenia aldehydów (np. dialdehydu malonowego), hydroksyaldehydów oraz węglowodorów (np. etanu, pentanu) [Puzanowska-Tarasiewicz i wsp. 2008]. Produkty peroksydacji lipidów służą jako markery do określenia stopnia utleniania [Young i Woodside 2001]. Stwierdzono wysokie stężenie wyżej wymienionych produktów procesów peroksydacji lipidów w surowicy pacjentów z chorobami wątroby, u cukrzyków oraz cierpiących na choroby układu krążenia, kataraktę i złośliwe nowotwory [Haberland i wsp. 1996].

Zmiany w błonie biologicznej, spowodowane procesami peroksydacji, skutkują zmianą jej właściwości fizycznych. Inna organizacja błony prowadzi do zaburzeń transportu, zmian aktywności łańcucha oddechowego, jak również do perturbacji przewodzenia sygnałów [Rutkowski i wsp. 2007]. Proces utleniania lipidów może prowadzić do zwiększenia lub zmniejszenia uporządkowania warstwy lipidowej błon [Soto i wsp. 2003].

Powyżej opisany proces peroksydacji lipidów to proces nienezymatyczny. Natomiast wiele ważnych biologicznie związków np. prostaglandyn, tromboksanów czy leukotrienów powstaje z kwasu arachidonowego, w wyniku utleniania indukowanego przez cyklooksygenazy i lipooksygenazy – enzymy katalizujące wbudowywanie cząsteczki tlenu w określoną pozycję łańcucha kwasu tłuszczowego, co skutkuje powstawaniem nadttlenków kwasów tłuszczowych [Puzanowska-Tarasiewicz i wsp. 2008].

2.3.4 Procesy peroksydacji w przemyśle

Procesy peroksydacji lipidów wywierają szkodliwy wpływ nie tylko na organizmy żywe, ale także na procesy zachodzące w przemyśle przetwórczym [Karawita i wsp. 2005]. W przemyśle spożywczym ważne jest stosowanie przeciwutleniaczy za względu na hamowanie procesów utleniania żywności, szczególnie bogatej w nienasycone kwasy tłuszczowe. Zapobiega to procesom pogorszenia jakości, właściwości sensorycznych i zdrowotnych żywności w tym

powstawania potencjalnie szkodliwych, a nawet toksycznych substancji. W przemyśle spożywczym stosowane są następujące przeciwutleniacze: izobutylohydroksyanizol - BHA, 3,5-diizobutylo-4-hydroksytoluen - BHT, tributylhydrochinon – TBHQ oraz galusan propylu - Pge (rys. 19).

Substancje te kontrolują procesy utleniania lipidów w żywności. Trwają poszukiwania naturalnych związków o aktywności przeciwutleniającej mogących zastąpić syntetyczne antyoksydanty, które często są szkodliwe lub wręcz toksyczne dla żywych organizmów. Na dodatek te naturalne substancje podawane jako nutraceutyki mogłyby zapobiegać powstawaniu nadmiaru wolnych rodników w organizmach [Madsen i wsp. 1998, Wettasinghe i Shahidi 1999, Karawita i wsp. 2005].

2.4 Substancje aktywne biologicznie

2.4.1 Przeciwutleniacze

Przeciwutleniacz to każda substancja, która w niskim stężeniu hamuje procesy utleniania [Young i Woodside 2001, Boots i wsp. 2008]. Zgodnie z tą definicją fizjologiczna rola przeciwutleniaczy polega na ochronie składników komórek przed uszkodzeniami wynikającymi z chemicznych reakcji angażujących wolne rodniki [Young i Woodside 2001]. Związki o charakterze przeciwutleniaczy mogą pełnić rolę zarówno ochronną, jak i terapeutyczną [Ratman i wsp. 2006]. Badania epidemiologiczne potwierdzają wpływ diety bogatej w przeciwutleniacze na znaczący spadek liczby zachorowań na choroby o podłożu wolnorodnikowym. „Paradoks francuski” polegający na powiązaniu diety wysokotłuszczowej Francuzów ze spożyciem czerwonego wina ma wpływ na zauważalnie mniejszą liczbą występowania chorób układu krążenia wśród mieszkańców tego kraju. Spożywanie czerwonego wina, bogatego między innymi w takie związki jak resweratrol (rys. 20) oraz antocyjany: delfinidyno-3-glukozyd, cyjanidyno-3-glukozyd oraz malwidyno-3-glukozyd, korzystnie wpływa na zdrowie [Tsuda i wsp. 1996].

Rynek preparatów zawierających związki o charakterze przeciwutleniaczy wciąż wzrasta. Zanieczyszczone środowisko i bardziej intensywny tryb życia powodują, że rośnie liczba zachorowań na choroby cywilizacyjne i społeczne. Wzrasta także zainteresowanie związkami o właściwościach przeciwutleniających w przemyśle kosmetycznym [Ratman i wsp. 2006].

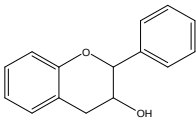
Wśród olbrzymiej ilości przeciwutleniaczy wyróżniono dwie główne grupy: przeciwutleniacze enzymatyczne i nieenzymatyczne (rys. 21).

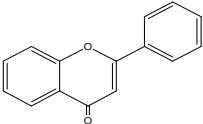
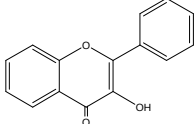
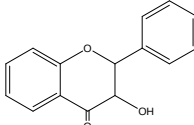
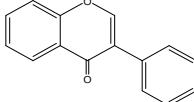
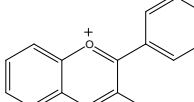
Antyoksydanty enzymatyczne to związki endogenne produkowane przez organizm, jako enzymy, niskocząsteczkowe związki oraz kofaktory enzymów. Przeciwutleniacze nieenzymatyczne są substancjami egzogennymi i muszą zostać dostarczone wraz z dietą [Ratman i wsp. 2006].

2.4.2 Budowa chemiczna i właściwości fizykochemiczne polifenoli

Związki polifenolowe stanowią pod względem struktury i właściwości zróżnicowaną grupę niskocząsteczkowych związków. Jest to liczna grupa związków o charakterystycznej budowie, będących wtórnymi metabolitami roślin [Duthie i wsp. 2003]. Dużą liczbę związków stanowią flawonoidy. Ich podstawowy szkielet składa się z 15 atomów węgla układających się w tzw. układ 1,3-difenylopropan-1-owy, zwany też benzo-gamma-pyrone. Stanowią go dwa pierścienie benzenowe połączone łańcuchem trójwęglowym lub pierścieniem heterocyklicznym C6-C3-C6 (rys. 22) [Grajek 2007, Arct i Pytlakowska 2008].

Wśród flawonoidów wyróżniono następujące klasy: flawanole, flawony, flawonole, flawanony, izoflawony i antocyjany (Tab. 6). Do polifenoli, oprócz flawonoidów, zaliczono proste polifenolowe nieflawonoidowe związki tworzone na drodze szlaku szikimowego - kwasy benzoesowe i cynamonowe. Polifenole różnią się stopniem uwodornienia pierścienia heterocyklicznego, liczbą i miejscem podstawienia grup hydroksylowych oraz stopniem ich glikozylacji i metoksylacji [Heim i wsp. 2002, Wilska-Jeszka i Sosnowska 2004, Bourgou i wsp. 2008].

KLASA FLAWONOIDÓW	PODSTAWOWA STRUKTURA SZKIELETU	PRZEDSTAWICIELE	WYSTĘPOWANIE
flawanole		(+)-katechiny	herbaty, kakao, brzoskwinie
		(-)- epikatechina	czerwone winogrona, wino
		galusan epikatechiny	herbaty
		galusan epigalokatechiny	herbaty

flawony		chryzyna	skórki owoców
		apigenina	pietruszka, seler, cytrusy
		rutyna	czerwone wino, gryka, cytrusy, skórka pomidora
		luteolina	czerwony pieprz, seler, czerwona papryka
flawonole		kemferol	por, brokuł, endywia, czarna herbata, grejfrut
		kwercetyna	cebula, sałata, brokuł, pomidor, herbata, czerwone wino, skórki jabłek, jagody
		mirycetyna	czerwone wino, żurawina
		rutyna	czerwone wino, gryka
flawanony		naryngina	cytrusy, grejfruty
		naryngenina	grejfruty
		taksifolina	cytrusy
		hesperydyna	pomarańcze
izoflawony		daidzeina	soja, groch, fasola
		genisteina	soja, groch, fasola
antocyjany		delfinidyna	kolorowe owoce, bakłażan
		cyjanidyna	wiśnie maliny, truskawki

Tab. 6. Klasy flawonoidów, ich ogólna struktura oraz przykłady występowania [Rice-Evans i wsp. 1997, Heim i wsp. 2002]

Flawonoidy są zdolne do hamowania procesów oksydacyjnych na drodze:

- zmiatania wolnych rodników,
- przerywania, czyli termiancji reakcji rodnikowych,
- wiązania metali katalizujących procesy utleniania,
- inhibicji enzymów z grupy oksydaz [Wilska-Jeszka i Podsędek 2000].

Flawonoidy działają jako przeciwutleniacze na drodze bezpośredniego wychwytywania wolnych rodników, takich jak anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, tlenek azotu. Mechanizm reakcji zmiatania wolnych rodników schematycznie przedstawiono na rysunku 23.

W wyniku reakcji wolnych rodników z cząsteczką flawonoidu powstają małoreaktywne rodniki flawonoidowe (FLO $\cdot$) charakteryzujące się zdolnością stabilizowania i przekazywania elektronów, które po reakcji z kolejnym wolnym rodnikiem tworzą stabilną formę chinonu [Malolepsza i Urbanek 2000, Pietta 2000, Duthie i wsp. 2003].

Flawonoidy są zdolne do kompleksowania jonów metali. Za właściwości te odpowiadają grupy: 3',4'-dihydroksy w pierścieniu B, 4-keto, 3-hydroksy oraz 4-keto, 5-hydroksy w pierścieniu C cząsteczki [Rice-Evans i wsp. 1997]. Możliwe miejsca kompleksowania jonów metali przez cząsteczkę flawonoidu przedstawiono na rysunku 24.

Zdolność flawonoidów do chelatowania jonów metali wpływa na ich wysoką aktywność opóźniania procesów starzenia oraz ma wpływ na prawidłowe ciśnienie i hamowanie stanów zapalnych [Arct i Pytlakowska 2008]. Warto zaznaczyć, że kompleksy, np. kwercetyny oraz katechin z Fe³⁺ są bardziej efektywne w wychwytywaniu wolnych rodników w porównaniu do ich form nieskompleksowanych [Zhao i wsp. 1998]. Na rysunku 25 przedstawiono schemat mechanizmu wychwytywania rodnika nadtlenkowego przez kompleks grupy katecholowej z żelazem [Zhao i wsp. 1998].

Aktywność przeciwutleniająca polifenoli związana jest z ich strukturą chemiczną, szczególnie z obecnością grup hydroksylowych. Na wysoką aktywność przeciwutleniającą flawonoidów mają wpływ następujące elementy budowy ich cząsteczek:

- ugrupowanie orto 3',4'-dihydroksy w pierścieniu B (obecne np. w katechinie, luteolinie, kwercetynie) umożliwia tworzenie wewnątrzcząsteczkowego

wiązania wodorowego pomiędzy tymi grupami, przez co zwiększa stabilność rodników fenoksyłowych [Rice-Evans i wsp. 1997]. Grupy hydroksylowe w pierścieniu B najłatwiej wychwytyją wolne rodniki. Zdolność wychwytywania wolnych rodników wzrasta liniowo ze wzrostem liczby grup OH w szeregu homologicznym flawonoidów oraz flawanonów [Heim i wsp. 2002]. Największą aktywność wykazują cząsteczki posiadające grupy hydroksylowe w pozycji „orto”, mniejszą w pozycji „para” a najmniejszą w pozycji „meta” [Arora i wsp. 1998]. Grupy 3',4'-katechol (rys. 26a) w pierścieniu B, grupa meta 5,7-dihydroksy w pierścieniu A, występujące np. w cząsteczce kemferolu, apigeniny oraz w cząsteczce chryzyny, silnie hamują procesy peroksydacji lipidów [Lemańska i wsp. 2001],

- obecność grupy 1,2,3-trihydroksybenzoesowej w pierścieniu B (tzw. grupy pirogalowej – rys. 26b) zwiększa aktywność przeciwutleniającą (np. w epikatechinie). Podobny efekt wywołuje reszta polifenolowa pierścienia B struktury flawonoidowej przy grupie 3-OH (np. w EGCG) [Pietta 2000],
- podwójne wiązanie pomiędzy atomami węgla C₂ i C₃ w pierścieniu C [Rice-Evans i wsp. 1997], które wraz z grupami 4-keto i 3-hydroksylową w pierścieniu C sprzyjają przemieszczeniu elektronów. Przestrzenne ułożenie pierścienia B i jego kąt nachylenia w stosunku do całej cząsteczki mają znaczny wpływ na aktywność przeciwutleniającą [Małolepsza i Urbanek 2000, Heim i wsp. 2002],
- obecność grupy karbonyłowej przy węglu C₄ w pierścieniu C [Rice-Evans i wsp. 1997],
- polimeryzacja jednostek flawonoidowych w większe agregaty [Heim i wsp. 2002]. Flawonoidy w wyniku polimeryzacji np. dwóch lub trzech cząsteczek tworzą struktury zwane taninami i procyanidynami [Arct i Pytkowska 2008],
- obecność grupy cukrowej zmniejsza aktywność przeciwutleniającą. Aglikony wykazują silniejszą aktywność, aniżeli formy glikozydowe, w których im więcej podstawników cukrowych tym słabszą aktywność przeciwutleniającą wykazują [Rice-Evans i wsp. 1997]. W naturze flawonoidy występują częściej formie 3-O-glikozydów (zwanych bioflawonoidami), aniżeli aglikonów [Arct i Pytkowska 2008]. Najczęściej występującymi podstawnikami cukrowymi są glukoza, ramnoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza [Heim i wsp. 2002] oraz

ksyloza [Merken i Beecher 2000, Duthie i wsp. 2003]. Rzadziej występują mannoza, fruktoza, a najrzadziej kwas glikuronowy i kwas galakturonowy [Duthie i wsp. 2003]. Glikozylacja cząsteczki dotyczy najczęściej pozycji C₃, rzadziej C₅, C₇ czy C₄ [Merken i Beecher 2000]. Podstawnik cukrowy zwiększa rozpuszczalność glikozydów w stosunku do aglikonów, które będąc wolnymi flawonoidami wykazują niską rozpuszczalność w wodzie, jednak są rozpuszczalne w substancjach organicznych [Arct i Pytkowska 2008].

2.4.3 Występowanie związków polifenolowych oraz ich rola w roślinach

Związki polifenolowe występują obficie zarówno w jadalnych, jak i niejadalnych roślinach [Wojdyło i Oszmiański 2007]. Są to substancje naturalnie występujące w roślinach jako ich wtórne metabolity. Występują w ziołach, warzywach, owocach, zbożach [Bourgou i wsp. 2008], w różnych częściach roślin np. liściach, nasionach, korze, a nawet w korzeni i kwiatach. Związki te obejmują bardzo liczną grupę. Jedne źródła podają, że do 2000 roku poznano 10000 flawonoidów [Małolepsza i Urbanek 2000], inne, że do 2002 roku 4000 [Heim i wsp. 2002] lub, że do 2008 roku poznano 5000 tych związków [Boot i wsp. 2008], a jeszcze inne, że do 2009 roku znanych było 9000 flawonoidów [Hernández i wsp. 2009].

Związki flawonoidowe rzadko spotykane są w bakteriach, glonach, porostach czy mszakach. Analizując układ systematyczny, występowanie flawonoidów można zauważyć dopiero wśród roślin naczyniowych od klasy paproci [Małolepsza i Urbanek 2000].

Związki polifenolowe chronią roślinę przed promieniowaniem ultrafioletowym, patogenami czy roślinożercami. Antocyjany pełnią rolę wabiącą owady przez co ułatwiają zapylenie roślin [Heim i wsp. 2002]. Flawonoidy są najważniejszą grupą barwników roślinnych, które nadają zabarwienie płatkom kwiatów i owocom. Związki te wykazują działanie przeciwwirusowe, przeciwgrzybowe oraz antybakteryjne. Pełnią rolę atraktantów organizmów symbiotycznych, regulują ekspresję genów oraz aktywność enzymów. Substancje te odstraszały owady przez co ochraniały roślinę przed żerowaniem owadów [Erlejman i wsp. 2004]. Flawonoidy w komórkach roślinnych pełnią również rolę wewnętrznych substancji przekąźnikowych gdyż wpływają na regulację poziomu kwasu indolilo-3-octowego (IAA). Pełnią także rolę sygnałów chemicznych dla innych organizmów biorących udział w zjawisku mikoryzy czy symbiozy oraz uczestniczą w zjawisku allelopatii [Małolepsza i Urbanek 2000].

2.4.4 Aktywność biologiczna związków polifenolowych

Dieta bogata w warzywa i owoce korzystnie wpływa na zdrowie i chroni przed chorobami. Temat absorpcji i metabolizmu flawonoidów jest jednak wciąż mało poznany. Dostępne wyniki wskazują, że biodostępność flawonoidów jest niska [Young i Woodside 2001]. Badania kliniczne potwierdzają zależność między ilością spożywanych owoców i warzyw, a obniżeniem liczby występowania, takich jak schorzeń: choroba wieńcowa, stany zapalne oraz nowotwory [Young i Woodside 2001, Duthie i wsp. 2003, Ren i wsp. 2003, Huang i wsp. 2005]. W odpowiednio zbilansowanej diecie należy pamiętać o spożyciu odpowiedniej ilości przeciwutleniaczy z warzyw, owoców oraz soków. Dokonując wyboru należy pamiętać, że nie wszystkie soki są źródłem dużej ilości przeciwutleniaczy. Oszmiański i wsp. [2007] wykazali, że najbardziej wartościowe, wśród soków, pod względem zawartości przeciwutleniaczy są soki mętne. Posiadają one około dwa razy wyższą zawartość polifenoli w porównaniu z sokami klarowanymi oraz, co jest z tym powiązane, wyższą aktywność przeciwrodnikową.

Flawonoidom przypisywane jest działanie przeciwutleniające, diuretyczne, przeciwbiegunkowe, przeciwzapalne oraz przeciwnowotworowe [Aaby i wsp. 2004, Luo i wsp. 2004]. Mechanizm wpływu flawonoidów na ekspresję genów w komórkach ssaków opisał Kuo w 2002 roku, natomiast rolę polifenoli w stabilizowaniu genomu przedstawił Ferguson w 2001 roku.

Działanie przeciwzapalne flawonoidów znalazło zastosowanie w kosmetologii. Dla przykładu glikozydy apigeniny obecne w rumianku inaktywują 5-lipoosygenazę oraz cyklooksygenazę, które odrywają kluczową rolę w przemianach kwasu arachidonowego do leukotreinów oraz prostaglandyn [Arct i Pytlakowska 2008]. Także inne flawonoidy, jak np. kwercetyna, apigenina oraz katechiny wykazują efekt przeciwzapalny poprzez hamowanie cyklooksygenazy 2 (COX2) oraz indukowanej syntazy tlenu azotu [Yao i wsp. 2004].

Polifenole hamują procesy proliferacji komórek poprzez inhibicję takich enzymów jak: białkowa kinaza tyrozynazy (ang. protein tyrosine kinase - PTK), białkowa kinaza C (ang. protein kinase C-PKC) oraz kinaza fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforanu (ang. phosphoinositide 3-kinases - PI3Ks) [Ren i wsp. 2003].

Związki flawonoidowe wykazują szereg właściwości biologicznych w tym antybakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwalergiczne, hamują agregację płytek krwi, zapobiegają zakrzepom oraz uszczelniają naczynia krwionośne [Bourgou i wsp. 2008]. Związki te uszczelniają naczynia krwionośne ponieważ ochraniają witaminę C przed reakcjami chemicznymi, a także na drodze hamowania aktywności metaloproteinaz degradujących kolagen i elastynę [Arct i Pytlakowska 2008].

Flawonoidy wykazują silne właściwości przeciwutleniające związane między innymi ze zdolnością do wychwytywania wolnych rodników, z inhibicją rodnikotwórczych reakcji enzymatycznych, z chelatowaniem metali oraz poprzez wykazywanie właściwości redukujących [Heim i wsp. 2002, Karawita i wsp. 2005, Bourgou i wsp. 2008]. Ponadto flawonoidy mogą wpływać na aktywność wielu enzymów biorących udział w tworzeniu RFT, takich jak oksydazy ksantynowej, lipoksygenaz, peroksydaz [Małolepsza i Urbanek 2000, Pietta 2000]. Związki flawonoidowe mogą w końcu brać udział w terminacji reakcji łańcuchowej tworzącej rodniki peroksyłowe oraz hydroksyperoksyłowe [Heim i wsp. 2002].

Związki te wykazują także korzystne działanie w terapii AIDS np. kwercetyna [Ono i wsp. 1990, Nair i wsp. 2009] i (-)-epikatechina [De Clercq 2000]. Flawonoidy są inhibitorami odwrotnej transkryptazy, przez co hamują namnażanie wirusa HIV. Badania przeprowadzone *in vitro* wykazały, że kwercetyna posiada zdolność hamowania wzrostu wielu linii komórek rakowych ludzi, takich jak nowotwory okrężnicy, piersi, jajników oraz płuc [Małolepsza i Urbanek 2000, Wilska-Jeszka i Sosnowska 2004]. Ren i wsp. [2003] wykazali, że zwiększenie spożycia przez mężczyzn mirycetyny zmniejsza zachorowalność na raka prostaty.

W tabeli 7 przedstawiono przykłady przeciwnowotworowego działania flawonoidów.

NOWOTWÓR LUDZKI	KOMÓRKI	FLAWONOID
jamy ustnej	HSC-2, HSG, SCC-25	flawanony, izoflawany, EGC, chalkony, EGCG, genisteina, ECG, kwercetyna
piersi	MCF-7	flawanony, genisteina, kwercetyna luteolina
tarczycy	ARO, NPA, WRO	genisteina, apigenina, kemferol, chryzyna,
płuc	SK-LU1, SW900, H441, H661, haGo-K-1, A549	flawony, kwercetyna
prostaty	LNCaP, PC3, DU145	katechina, epikatechina, kwercetyna, kemferol, luteolina, apigenina, sylimaryna
jelita grubego	Caco-2, HT-29, IEC-6, HCT-15	flawony, kwercetyna, genisteina, antocyjany
białaczka	HL-60, K562, Jurkat	apigenina, kwercetyna, chalkony
czerniak	4A5	chalkony

Tab. 7. Przykłady przeciwnowotworowych właściwości flawonoidów, komórek na które działają oraz jakim nowotworom zapobiegają [Ren i wsp. 2003].

Właściwości przeciwzapalne flawonoidów zostały zastosowane w dermatologii w leczeniu takich schorzeń jak trądzik różowaty czy łuszczyca. Łagodzą one podrażnienia i wybielają przebarwienia skórne [Arct i Pytlakowska 2008].

Właściwości prozdrowotne przeciwutleniaczy zainspirowały do podejmowania prób modyfikacji genetycznych, mających na celu zwiększenie syntezy tych związków w roślinach np. w transgenicznym bulwach ziemniaków [Łukaszewicz i wsp. 2002, Stobiecki i wsp. 2003]. Analiza bulw transgenicznych ziemniaków z nadekspresją białka 14-3-3 wykazała o 45 % wyższą aktywność przeciwutleniającą w zmodyfikowanych bulwach w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Przeciwny efekt zaobserwowano w bulwach transgenicznych z represją białka 14-3-3. Wykazano, że zmiany aktywności przeciwutleniającej powiązane były z ilością kwasów fenolowych

oraz antocyjanów. Poziom kwasów fenolowych i antocyjanów był silnie skorelowany ($r = 0,92$) z regulacyjną rolą białka 14-3-3 w biosyntezie związków przeciwutleniających [Łukaszewicz i wsp. 2002].

2.4.5 Oddziaływanie flawonoidów z błoną lipidową

Istnieją dwa prawdopodobne mechanizmy oddziaływania flawonoidów z błoną lipidową:

- adsorpcja na powierzchni błony i interakcja hydrofilowych flawonoidów z polarnymi głowami lipidów na powierzchni woda:lipid poprzez wiązania wodorowe,
- wnikanie hydrofobowych flawonoidów w niepolarny rejon błony (rdzeń) [Erlejman i wsp. 2004, Oteiza i wsp. 2005].

Sposób oddziaływania flawonoidów z błoną ma wpływ na ich aktywność przeciwutleniającą. Kompleksy flawonoidów z błoną mogą chronić błonę przed szkodliwym działaniem czynników zewnętrznych [Erlejman i wsp. 2004]. Badany jest wpływ flawonoidów na płynność błon oraz lokalizacją tych związków w błonach biologicznych z zastosowaniem liposomów jako układu modelowego [Arora i wsp. 2000, Erlejman i wsp. 2004].

W celu określenia sposobu oddziaływania flawonoidów z błoną stosowane są następujące badania:

- wyznaczanie współczynnika podziału oktanol:bufor [Foti i wsp. 1996, Vaes i wsp. 1998, Gordon i wsp. 2001, Nenadis i wsp. 2003, Erlejman i wsp. 2004],
- wyznaczanie stałych dysocjacji (K_d) flawonoidów pomiędzy błoną liposomów a bufor na podstawie równania Sterna-Volmera - poprzez pomiar zmian fluorescencji sondy [Verkman 1980, Van Dijk i wsp. 2000, Tammela i wsp. 2004],
- pomiar wpływu flawonoidów na płynność błony poprzez pomiar zmian anizotropii fluorescencji [Arora i wsp. 2000] lub polaryzacji sondy [Erlejman i wsp. 2004],
- wpływu przeciwutleniaczy na przemiany fazowe błon - skaningowa kalorymetria różnicowa (ang. differential scanning calorimetry – DSC) [Van Dijk i wsp. 2000].

Pomiar anizotropii fluorescencji sondy jest szeroko stosowaną techniką do badania wpływu różnych molekuł na właściwości fizyczne membran, w szczególności na

płynność błony biologicznej. Pod pojęciem płynności błony należy rozumieć względną swobodę ruchu cząsteczek w błonie lipidowej [Arora i wsp. 2000]. Wyniki badań wskazują, że flawonoidy mogą lokować się w hydrofobowym rdzeniu błony, przez co stabilizują błonę i chronią ją przed procesami utleniania [Arora i wsp. 2000]. Van Dijk i wsp. [2000] określili współczynnik podziału przykładowych flawonoidów. Stwierdzili oni, że relatywna hydrofobowość tych związków zależy od ilości grup hydroksylowych w cząsteczce (maleje wraz ze wzrostem liczby grup hydroksylowych) oraz od budowy przestrzennej cząsteczki (płaska struktura przestrzenna jest preferowana w oddziaływaniu z błoną). Flawanony są bardziej hydrofobowe w porównaniu do flawonoli o takim samym stopniu hydroksylacji, a jednak wykazują mniejsze powinowactwo do błony w porównaniu z flawanolami, które mają płaską budowę przestrzenną cząsteczki [Van Dijk i wsp. 2000]. Ollila i wsp. [2002] zbadali interakcje pomiędzy flawonoidami a membraną DPPC. Zauważyli oni, że flawonoidy, które zawierały w swojej cząsteczce liczne grupy hydroksylowe silnie wiązały się z błoną. Zasugerowali, że jest to związane z tworzeniem wiązań wodorowych [Ollila i wsp. 2002, Tammela i wsp. 2004].

Lokujące się w błonie związki mogą wpływać na zmianę właściwości błon w tym na zmianę temperatury przejścia fazowego. Kwercetyna i naringenina w pH 7,4 obniżają temperaturę przejścia fazowego DPPC w liposomach, ponieważ w neutralnym pH oba te flawonoidy lokują się w hydrofobowej części błony [Oteiza i wsp. 2005].

2.4.6 Polifenolowe ekstrakty roślinne

Berberys

Berberys zwyczajny (*Berberis vulgaris* L.) należy do rodziny berberysowatych (*Berberidaceae*) zaliczanej do jaskrowców (*Ranunculales*). Rośnie w Azji oraz w Europie. Berberys jest kolczastym krzewem o wysokości 1-3 m o odwrotnie jajowatych lub eliptycznych liściach. Niektóre liście przekształcone są w kolce. W okresie kwitnienia, przypadającym na maj-czerwiec, na roślinie pojawiają się żółte, promieniste kwiaty zebrane w groniaste, zwisające kwiatostany (rys. 27). Owoce berberysu swój czerwony kolor (rys. 27) zawdzięczają obecności antocyjanów w tym: pelargonidyny, delfinidyny, cyjanidyny, malwidyny, petunidyny oraz peonidyny (rys. 28) [Copokonyooe i wsp. 2005].

Antocyjany te najczęściej występują w postaci glikozydów, takich jak: delfinidyno-3-glukozyd, petunidyno-3-glukozyd, cyjanidyno-3-glukozyd, malwidyno-3-glukozyd, cyjanidyno-3-rutynozyd, petunidyno-3-rutynozyd, peonidyno-3-glukozyd, delfinidyno-3-rutynozyd oraz malwidyno-3-rutynozyd (rys. 29) [Wallace i Giusti 2008].

Surowcami leczniczymi berberysu są korzenie, kora, liście oraz owoce, które są wykorzystywane w tradycyjnej irańskiej medycynie [Shamsa i wsp. 1999, <http://www.biology.pl>]. Berberys wykazuje działanie antybakteryjne [Shamsa i wsp. 1999, Janbaz i Gilani 2000, Fatehi i wsp. 2005, Motalleb i wsp. 2005, Gautam i wsp. 2007, Singh i wsp. 2007], przeciwgrzybiczne [Iauk i wsp. 2007], przeciwzapalne, przeciwgorączkowe, przeciwreumatycznie [Shamsa i wsp. 1999, Küpeli i wsp. 2002, Fatehi i wsp. 2005, Motalleb i wsp. 2005, Gautam i wsp. 2007, Iauk i wsp. 2007], przeciwbiegunkowe, przeciwarytmiczne, obniżające ciśnienie [Fatehi i wsp. 2005], tonizujące [Shamsa i wsp. 1999, Motalleb i wsp. 2005] oraz żółciopędne [Shamsa i wsp. 1999]. W tradycyjnej medycynie irańskiej berberys jest stosowany w przypadkach kamienicy żółciowej oraz czerwonki [Ivanovska i Philipov 1996, Shamsa i wsp. 1999, Motalleb i wsp. 2005]. Dzięki właściwościom bakteriobójczym oraz przyspieszającym gojenie berberys jest cenną rośliną kosmetyczną. Wyciągi z owoców berberysu stosowane są w kosmetyce do pielęgnacji skóry uszkodzonej przez promienie słoneczne ze względu na właściwości łagodzące stany zapalne. Owoce berberysu wchodzi w skład środków kosmetycznych używanych do pielęgnacji skóry zniszczonej, przesuszonej, z oznakami starzenia się oraz łuszczącej się. Maseczki z tych owoców polecane są w przypadku problemów skórnych, takich jak trądzik, a także w przypadku siniaków. Wysoka zawartość witaminy C, flawonów oraz flawonoidów w owocach berberysu powoduje, że jest cennym składnikiem preparatów likwidujących przebarwienia skóry.

Dereń

Dereń pospolity (*Cornus mas* L.) to krzak lub drzewo osiągające wysokość do 7-8 m [Demir i Kalyoncu 2003]. Pędy derenia są zielone lub brązowawe. Szeroko eliptyczne lub jajowate liście z kępkami włosków na spodniej stronie rozmieszczone są naprzeciwległe. Wczesną wiosną, jeszcze przed rozwinięciem się liści, pojawiają się małe, żółte kwiaty zebrane w niewielkie, prawie siedzące baldaszki (rys. 30).

Czerwonowiśniowe, jadalne owoce są kształtu elipsoidalnego (rys. 31). Dojrzewają we wrześniu. Osiągają 1,5 - 2 cm długości oraz zawierają twardą pestkę [<http://www.biology.pl>].

Owoce derenia bogate są w antocyjany takie jak delfinidyno-3-galaktozyd, cyjanidyno-3-galaktozyd (rys. 32) oraz peralgonidyno-3-galaktozyd [Seeram i wsp. 2002].

Według Tural i wsp. [2008] zawartość poszczególnych antocyjanów maleje w następującym porządku: pelargonidyno-3-glukozyd, cyjanidyno-3-glukozyd, cyjanidyno-3-rutozyd. Vareed i wsp. [2006] sugerują, że najwięcej jest cyjanidyno-3-galaktozydu. Pelargonidyno-3-galaktozyd oraz delfinidyno-3-galaktozyd występują w mniejszych ilościach. Owoce derenia są także bogatym źródłem witaminy C 103 mg/100g suchej masy, czyli około 7,2 razy więcej aniżeli czarne jagody [Pantelidis i wsp. 2007]. Należy zaznaczyć, że na zawartość flawonoidów w owocach mają wpływ warunki wzrostu.

Dereń posiada szeroką aktywność biologiczną w tym między innymi właściwości: przeciwzapalne, przeciwbólowe, przeciwbakteryjne, tonizujące, ściągające, diuretyczne oraz przeciwbiegunkowe [Seeram i wsp. 2002, Demir i Kalyoncu 2003, Varred i wsp. 2006, Sultana i Lee 2007, Tural i Koca 2008]. Większość wyżej wymienionych właściwości, a także właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe oraz przeciw cukrzycy, wynikają z obecności zawartych w dereniu antocyjanów. Ilość tych związków przewyższa w znacznym stopniu zawartość antocyjanów w innych owocach [Vareed i wsp. 2006, Vareed i wsp. 2007]. Dereń wykazuje właściwości hamujące działanie elastazy, enzymu zdolnego do degradacji elastyny - białka o budowie fibrylarnej obecnego w tkance łącznej. Inhibicja elastyny jest także skutecznie spowalnia procesy starzenia się skóry, co daje nadzieję na możliwość wykorzystania derenia w kosmetyce [Sultana i Lee 2007]. Dojrzałe owoce derenia ze względu na smaczny i słodki smak po dojrzewaniu, można używać do wyrobu przetworów i nalewek na tzw. dereniówkę.

Mahonia

Mahonia ostrolistna (*Mahonia aquifolium*) to krzew o wysokości do 1 metra o blaszkowatych z wierzchu błyszczących a od dołu matowych liściach. Kwiaty są żółte, w gęstych, szczytowych gronach wyrastających na wierzchołkach zeszłorocznych pędów, kwitną w końcu kwietnia i maja (rys. 33). Owoce są granatowoczarne pokryte

jasnoniebieskim nalotem (rys. 33). Mahonia występuje w zachodniej części Ameryki Północnej.

Mahonia wykazuje działanie przeciwzapalne, przeciwbakteryjne oraz przeciwgrzybicze [Volleková i wsp. 2003]. Mahonia stosowana jest w leczeniu wyprysków oraz łuszczycy [Rackova i wsp. 2007]. Etanolowe 10% wyciągi z mahonii hamują aktywność lipooksygenazy, która odgrywa dużą rolę w patofizjologii stanów zapalnych [Rackova i wsp. 2007]. Košťálova i wsp. [2001] wykazali wpływ mahonii na produkcję interleukin-8 (IL-8) oraz wykazali jej hamujący wpływ na czynniki TNF-alfa i TNF-beta.

Ogórecznik

Ogórecznik lekarski (*Borago officinalis*) jest rośliną jednoroczną osiagającą długość do 60 cm. Kwiaty na długich szypułkach, około 2 cm średnicy, są zwykle koloru niebieskiego (rys. 34).

Owoce ogórecznika są owalne o jasnobrązowej barwie [Hlava i wsp. 1984]. Cała roślina pokryta jest włoskami, a po roztarciu wydziela intensywny zapach. Surowcem jest ziele zawierające alkaloidy, związki cyjanogenne, alantoinę, śluz, garbniki, kwasy organiczne, cholinę, saponinę, sole mineralne oraz flawonoidy w tym pochodne kwercetyny. Z nasion otrzymywany jest olej zawierający wiele niezbędnych dla człowieka nienasyconych kwasów tłuszczowych (m. in. do 20% kwasu gamma-linolenowego (GLA)) [Wettasinghe i Shahidi 1999, Jędrzejko i wsp. 2006].

Ziele ogórecznika wykazuje działanie bakteriobójcze, przeciwzapalne oraz uodparniające. *Borago officinalis* stosowany jest w stanach zapalnych skóry, oparzeniach, owrzodzeniach, obrzękach spowodowanych stłuczeniami. Wykazuje on działanie przyspieszające regenerację naskórka oraz uszczelniające naczynia krwionośne. Przetwory w ogórecznika stosowane są jako środki ułatwiające gojenie oparzeń promieniowanymi ultrafioletowym. Ogórecznik cieszy się powodzeniem w kosmetyce jako środek uelastyczniający skórę, ujędrniający oraz zmniejszający wyprysk. Stosowany jest w preparatach do cery trądzikowej, mającej tendencję do pęknięcia naczynek oraz łuszczenia się [Jędrzejko i wsp. 2006]. Olej z nasion ogórecznika obniża poziom cholesterolu oraz trójglicerydów we krwi [Gilani i wsp. 2007].

Arnika

Arnika należy do rodziny Asteraceae (Astrowate). Jest to bylina o poziomym, o prawie cylindrycznym kłacu i wielu korzeniach. Liście odziomkowe tworzą rozetę. Liście łodygowe są nieliczne, naprzeciwległe oraz lancetowate. Łodyga osiąga wysokość do 50 cm i pokryta jest włoskami. Kwiaty arniki są duże, pomarańczowożółte, zebrane w koszyczki (rys. 35).

Okres kwitnienia przypada na koniec czerwca do sierpnia. Arnika rozpowszechniona jest w Europie. Rośnie na pastwiskach i łąkach w górach oraz na nizinach i terenach bagnistych [Hlava i wsp. 1984]. Surowcem zielarskim jest kwiat (*Flos Arnicae*) i koszyczek (*Anthodium Arnicae*.) Stosowana zewnętrznie działa bakteriostatycznie, przeciwzapalnie, przeciwzakrzepowo, przeciwobrzękowo, przyspiesza wchłanianie krwioaktywatorów, goi rany, wrzody i oparzenia. Ma działanie uszczelniające naczynia krwionośne, przeciwwysiękowe oraz pobudzające krążenie krwi. Związki czynne arniki zapobiegają przenikaniu osocza poza łożysko żylne, sprzyjają stopniowemu wchłanianiu się płynu wysiękowego, zmieniają ciśnienie na zewnątrz i wewnątrz drobnych naczyń podskórnych. Rzadziej stosuje się ją doustnie w zaburzeniach wieńcowego i mózgowego krążenia krwi [<http://www.farmakognozja.farmacja.pl>]. W kosmetyce arnika stosowana jest w kremach przeciwzapalnych i oczyszczających oraz na rozszerzone naczynka. Arnika stosowana jest również w kosmetykach do pielęgnacji włosów [Hlava i wsp. 1984, Jędrzejko i wsp. 2006]. Arnika zewnętrznie stosowana jest na krwaki, stłuczenia, obrzęki pourazowe oraz oparzenia.

Arnika zawiera flawonoidy w tym kwercetynę, kemferol, cholinę, kwasy aromatyczne takie jak: kawowy, chlorogenowy, galusowy; fitosterole, karotenoidy, terpeny, garbniki oraz olejki eteryczne, np. tymol [Jędrzejko i wsp. 2006].

Zielona herbata

Herbata (*Camellia sinensis*) (rys. 36) to najczęściej, zaraz po wodzie, konsumowany napój.

Rozróżnia się trzy typy herbaty w zależności od stopnia fermentacji: zielona herbata - niefermentowana, oolong – częściowo fermentowana oraz czarna - fermentowana [Henning i wsp. 2005, Cheng 2006]. Zielona herbata zawiera fluor, żelazo, magnez, potas, wapń, fosfor, cynk oraz witaminy: A, B, B₂, B₁₂, C, E, poza tym

saponiny, karotenoidy, flawonoidy oraz olejki eteryczne [Jędrzejko i wsp 2006]. Herbata wykazuje aktywność farmaceutyczną i kosmetyczną [Frauen i wsp. 2002]. W kosmetyce zielona herbata stosowana jest w preparatach przeznaczonych do cery zanieczyszczonej, suchej, tłustej oraz trądzikowej [Jędrzejko i wsp 2006]. Zielona herbata chroni przed fotostarzeniem skóry [Frauen i wsp. 2002], wykazuje działanie tonizujące, regenerujące, przeciwzapalne oraz ściągające [Jędrzejko i wsp 2006]. Flawonoidy zawarte w zielonej herbacie wykazują działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, hamujące agregację płytek, zapobiegające miażdżycy, chorobom wieńcowym oraz chorobom neurodegeneracyjnym [Ahmed i wsp. 2002, Caturla i wsp. 2003, Cheng 2006, Sutherland i wsp. 2006, Devika i wsp. 2007]. Zielona herbata zawiera wiele flawonoidów w tym: katechiny (C), (+)-galokatechiny (GC), galusan katechiny (CG), galusan (+)-galokatechiny (GCG) [Sutherland i wsp. 2006] oraz (-)-epigalokatechiny (EGC), (-)-epikatechiny (EC), galusan (-)-epigalokatechiny (EGCG), galusan (-)-epikatechiny (ECG) [Henning i wsp. 2005, Sutherland i wsp. 2006, Devika i wsp. 2007]. Strukturę wymienionych wyżej katechin przedstawiono na rysunkach 37 i 38.

Camellia sinensis przeciwdziała tworzeniu się złożeń na ściankach naczyń krwionośnych, w związku z tym przypisuje się jej również właściwość przeciwmiażdżycowe i obniżania ciśnienia. Przeciwmiażdżycowe działanie zielonej herbaty polega na hamowaniu powstawania tromboksanów, powodujących agregację płytek krwi. Badania epidemiologiczne wykazały pozytywny wpływ spożywania zielonej herbaty na spadek występowania chorób układu krążenia [Devika i wsp. 2007]. Zielona herbata zmniejsza w surowicy krwi poziom substancji produkowanej przez organizm w stanach zapalnych - poziom białka C-reaktywnego (CRP). Przeciwzapalne działanie zielonej herbaty polega także na inhibicji ekspresji genów czynnika TNF-alfa przez hamowanie aktywacji NFkappaB i AP-1 [Hou i wsp. 2004, Cheng 2006, Devika i wsp. 2007]. TNF-alfa jest znanym mediatorem chronicznego stanu zapalnego między innymi w reumatoidalnym zapaleniu stawów [Cheng 2006]. Zielona herbata zapobiega chorobom zwyrodnieniowym stawów ponieważ hamuje interleukiny-1 beta (IL-1 beta), cyklooksygenazy-2 (COX-2) oraz syntazy tlenu azotu (iNOS) ludzkich chondrocytów pochodzących z tkanek objętych chorobą zwyrodnieniową chrząstki stawów [Ahmed i wsp. 2002, Ahmed 2010]. Zielona herbata może być lekiem na wciąż rosnącą epidemię metabolicznego syndromu X, czyli zaburzeń metabolicznych w skład których wchodzi insulinooporność, nadciśnienie, otyłość, wysoki poziom trójglicerydów

i lipoprotein LDL oraz niski poziom lipoproteid HDL. Polifenole zawarte w zielonej herbacie wykazują działanie przeciwnowotworowe. Mechanizm takiej aktywności polifenoli opisał Hou i wsp. (2004). Ekstrakt z zielonej herbaty stosuje się w fotoprotekcji przed promieniowaniem UV, chroni skórę przed nowotworami [Fang i wsp. 2006].

Camellia sinensis wykazuje również działanie odchudzające, które polega na:

- stymulacji metabolizmu lipidów,
- inhibicji lipaz, hamując wchłanianie tłuszczów i przez to odkładanie ich nadmiaru w postaci tkanki tłuszczowej,
- stymulowaniu termogenezy,
- modulowaniu apetytu [Cheng 2006].

Katechiny z herbaty wykazały aktywność przeciwutleniającą, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [Caturla i wsp. 2003, Sutherland i wsp. 2006]. Za właściwości przeciwutleniające zielonej herbaty w dużej mierze odpowiada EGCG [Ahmed i wsp. 2002]. EGCG wykazuje 25-100 razy silniejszą aktywność przeciwutleniającą w porównaniu ze znanymi przeciwutleniaczami, takich jak witamina C i witamina E [Ahmed 2010]. Badania porównawcze aktywności czarnej herbaty z zieloną wykazały, że zielona herbata ma wyższą aktywność przeciwutleniającą, ponieważ procesy fermentacji, którym jest poddawana powodują przekształcenie katechin w flawiny i rubiginy. Proces fermentacji, w wyniku którego powstaje czarna herbata zmniejsza o połowę ilość aktywnych składników [Tapiero i wsp. 2002, Cheng 2006]. Enzymatyczne utlenianie zielonej herbaty do czarnej herbaty podczas procesów fermentacji skutkuje polimeryzacją flawonoidów do tanin, procyanidyn [Heim i wsp. 2002].

3 CEL PRACY

Głównym celem podjętych badań w pierwszym etapie było wyłonienie spośród wybranych ekstraktów polifenolowych oraz niektórych flawonoidów, obecnych w tych ekstraktach, tych o najwyższej aktywności przeciwutleniającej w stosunku do błon liposomów fosfatydylocholinowych oraz określanie ich prawdopodobnego mechanizmu przeciwutleniającego działania.

Celem dodatkowym badań w drugim etapie było określanie efektywności zamykania przeciwutleniaczy wyłonionych w pierwszym etapie badań jako najefektywniejsze w liposomach formowanych z różnych fosfolipidów z dodatkiem cholesterolu i bez niego, dla zaproponowania suplementu diety o możliwie wysokich parametrach fizyko-chemicznych. Badania nad stworzeniem takiego suplementu diety poprzedzono określaniem właściwości fizycznych liposomów formowanych z lipidów o zmieniającej się długości łańcucha acylowego i jego stopniu nienasycenia. W badaniach w pierwszym etapie zastosowano ekstrakty polifenolowe z następujących surowców:

- owoców: berberysu, derenia, mahonii,
- ziała: ogórecznika, arniki i zielonej herbaty

oraz następujące flawonoidy: cyjanidynę, cyjanodino-3-galaktozyd, kwercetynę, kwercetyno-3-galaktozyd, kwas chlorogenowy, galusan epigalokatechiny (EGCG) oraz epikatechinę.

Do badań określenia właściwości fizycznych liposomów zastosowano lipidy posiadające w łańcuchach acylowych po od 12 do 22 atomów węgla oraz lipidy o różnym stopniu nienasycenia tych łańcuchów posiadające od 1 do 4 wiązań podwójnych.

W drugim etapie badań, określenia efektywności zamykania przeciwutleniaczy zastosowano te lipidy, które we wcześniejszych badaniach wykazały najlepsze właściwości fizyczne dla tworzonych z nich liposomów, czyli DPPC, HSPC, EYPC, dioleoilofosfatydylocholiny (18:1) oraz dilinoleilofosfatydylocholiny (18:2).

4 MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ

4.1 Odczynniki

- AAPH, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (czystość 99%), DPPH, Troloks, oktanol-1, TPTZ, DMF, rutyna (85% czystość), kwas galusowy, 5(6)-karboksyfluoresceina, NaOH, Sephadex G-50, Triton X-100, cholesterol, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pochodziły z Sigma-Aldrich,
- FeCl_3 (czystość 97%), TBA (98%), $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pochodziły z Fluka,
- kwas askorbinowy, kwas octowy, octan sodu, węglan sodu, odczynnik Folina-Ciocalteu, KCl, chloroform pochodziły z POCH Gliwice,
- metanol, etanol, TRIS pochodziły z „Chempur” Piekary Śląskie,
- TCA, HCl pochodziły z „Stanlab” P.P.H. Lublin,
- sondy fluorescencyjne (DPH, TMA-DPH) pochodziły z Molecular Probes (Eugene, OR).

4.2 Roztwory

Nazwy i składy stosowanych buforów oraz roztworów:

NAZWA	SKŁAD
bufor TRIS-HCl pH=7,4	125 ml TRIS (0,2 M) 212,5 ml HCl (0,1 M) 162,5 wody destylowanej
bufor fosforanowy „A” pH=7,4	48 ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,154 M) 400 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,103 M)
TCA	75 g TCA 125 ml HCl 1 M 375 ml wody destylowanej
TBA	1,85 g TBA 125 ml HCl 1 M 375 ml wody destylowanej
odczynnik FRAP pH=3,3 - 3,4	75 ml 0,3 M octanu sodu 925 ml 0,3 M kwasu octowego

4.3 Materiał badawczy

4.3.1 Ekstrakty roślinne

NAZWA	NAZWA ŁACIŃSKA	RODZINA	CZĘŚĆ ROŚLINY Z KTÓREJ OTRZYMANO EKSTARKT
berberys pospolity	<i>Berberis vulgaris</i>	<i>Berberidaceae</i>	owoc
dereń jadalny	<i>Cornus mas</i>	<i>Cornaceae</i>	owoc
mahonia ostrolistna	<i>Mahonia aquifolium</i>	<i>Berberidaceae</i>	owoc
ogórecznik lekarski	<i>Borago officinalis</i>	<i>Boraginaceae</i>	ziele
zielona herbata	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Theaceae</i>	ziele
arnika górską	<i>Arnica montana</i>	<i>Asteraceae</i>	ziele

- Ekstrakty polifenolowe z berberysu, derenia oraz mahonii otrzymano w Katedrze Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Do 5,00 g miazgi z owoców dodawano 10 ml 80 % metanolu zakwaszonego kwasem solnym (1 ml kwasu na 1 l). Próby wstawiono do płuczki ultradźwiękowej na 10 minut. Po upływie tego czasu przeprowadzano ekstrakcję na lejkach Schotta pod próżnią. Przesącz zbierano do kolbek miarowych na 50 ml.
- Ekstrakty polifenolowe z ogórecznika, zielonej herbaty oraz arniki otrzymano w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Akademii Medycznej we Wrocławiu, według wewnętrznej procedury Zakładu. Surowce poddawano kilkudniowej maceracji mieszaniną metanolu z wodą (7/3, v/v). Odparowano metanol na wyparce próżniowej w temperaturze 40 °C. Pozostałość zamrożono i zliofilizowano

4.3.2 Flawonoidy

FLAWONOIDY	POCHODZENIE
cyjanidyna	Extrasynthese (France)
cyjanidyno-3-galaktozyd (Ideain chloride)	Extrasynthese (France)
kwercecytyna	Sigma
kwercecytyno-3-galaktozyd (Hyperoside)	Extrasynthese (France)
kwas chlorogenowy	Sigma
(-)-epikatechina	Sigma
(-)-galusan epigalokatechiny (EGCG)	Sigma

Charakterystykę zastosowanych flawonoidów zebrano w tabeli 1.

4.3.3 Lipidy

Fosfatydylocholina jajeczna (EYPC) (>99%) do badań procesów utleniania pochodziła z Lipids Products (Anglia). Uwodorniona fosfatydylocholina sojowa (HSPC) (>98%) pochodziła z Phospholipids (Niemcy). Lipidy do badań właściwości fizycznych liposomów uzyskano w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu zgodnie z procedurą opisaną w pracy Paltauf i Hermetter (1994). Lipidy wykorzystane w niniejszej pracy zestawiono w tabeli 2.

4.4 Metodyka badań

4.4.1 Otrzymywanie liposomów

Odpowiednią ilość lipidu rozpuszczonego w chloroformie odparowano pod próżnią w atmosferze azotu, a następnie osuszano w eksykatorze przez 120 minut pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchy film lipidowy hydratowano w buforze TRIS-HCl, pH=7,4 wytrząsając mechanicznie przez około 15 min w temperaturze o 5-10 °C powyżej temperatury przejścia fazowego lipidu. Dla uzyskania liposomów jednowarstwowych otrzymaną zawiesinę:

- sonifikowano przez 15 minut w temperaturze powyżej temperatury przemiany fazowej. Liposomy otrzymane w wyniku sonifikowania wykorzystywano do: pomiaru stopnia inhibicji utleniania liposomów EYPC (4.4.3); badania wpływu

karboksyfluoresceiny (4.4.12) i efektywności zamykania karboksyfluoresceiny (4.4.13); pomiaru rozmiarów liposomów (4.4.14).

- b) przeciskano 30-krotnie przez filtry poliwęglanowe o średnicy 100 nm w temperaturze powyżej temperatury przemiany fazowej lipidu. Pęcherzyki lipidowe otrzymane w wyniku kalibracji przez filtry zastosowano do: pomiaru rozmiarów liposomów (4.4.14).
- c) poddano 10 cyklom zamrażania w ciekłym azocie i rozmrażania powyżej temperatury przemiany fazowej lipidów, a następnie sonifikowano przez 5 min. Liposomy otrzymane metodą FAT stosowano do: pomiaru rozmiarów liposomów (4.4.14) i badania efektywności zamykania przeciwutleniaczy (4.4.17).

Stężenie lipidu w próbkach zmieniało się w granicach 0,04 - 25 mg/ml w zależności od charakteru badań.

4.4.2 Otrzymywanie błon liposomowych do badań fluorymetrycznych

W atmosferze azotu odparowywano mieszaninę 3 mg lipidu z 11 μ l sondy DPH (1,6-difenylo-1,3,5-heksatrienu) lub 22 μ l sondy TMA-DPH (p-toluenosulfonianu 1-(4-trimetyloamoniofenylo)-6-fenylo-1,3,6-heksantrienu) oraz niewielką ilością chloroformu - ok. 100 μ l. Przygotowano 1 mM roztwór sondy. Sondę DPH rozpuszczono w DMF, natomiast TMA-DPH w DMSO.

Mieszaninę lipidu z sondą osuszano w eksykatorze przez 3 godziny. Do suchego filmu lipidowego dodawano 3 ml buforu fosforanowego A i sonifikowano przez 10 minut lub przeciskano 30-krotnie przez filtry poliwęglanowe o średnicy porów 100 nm w temperaturze powyżej temperatury przemiany fazowej lipidu.

4.4.3 Pomiar inhibicji utleniania liposomów EYPC– TBARS

Do pomiaru poziomu inhibicji utleniania błon liposomów EYPC zastosowano metodę oznaczenia stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (ang. thiobarbituric acid reactive substances – TBARS). Produkt utleniania lipidu – dialdehyd malonowy, w reakcji z kwasem tiobarbiturowym, w kwaśnym środowisku, tworzy barwny addukt z maksimum absorbancji przy długości fali 535 nm (rys. 39). Czynnikiem indukującymi procesy peroksydacji błon liposomów EYPC były: związek AAPH, jony Fe^{2+} /askorbinian, promieniowanie UVC.

a) AAPH (chlorowodorek 2,2-azobis(2-amidynopropanu) - rys.17a

Do zawiesiny liposomów (1,5 mg/ml lipidu EYPC, w buforze 50 mM TRIS-HCl, pH= 7,4) otrzymanych według procedury 4.4.1.a dodawano odpowiednią ilość przeciwutleniacza oraz taką ilość induktora utleniania – AAPH, aby jego końcowe stężenie wynosiło 20 mM. Objętość końcowa próby wynosiła 3 ml. Do próby kontrolnej dodawano odpowiednią ilość samego rozpuszczalnika przeciwutleniaczy. 0,5 ml próby kontrolnej (dla czasu $t = 0$ min pobieranej przed dodaniem induktora utleniania) dodawano do 2 ml mieszaniny kwasu TBA z kwasem TCA (1:1, v/v). Inkubowano przez 15 min w temperaturze 100 °C. Próby kontrolne następnie wirowano przez 15 min przy 2500 obr/min w temperaturze pokojowej. Badane próby w obecności AAPH oraz przeciwutleniaczy inkubowano 30 min w ciemności w temperaturze 37 °C. Po inkubacji pobierano z próby 0,5 ml i dodawano 2 ml mieszaniny kwasu TBA z kwasem TCA (1:1, v/v). Postępowano identycznie jak z próbami kontrolnymi. Dla wszystkich odwirowanych prób stężenie powstałego barwnego adduktu dialdehydu malonowego z kwasem TBA oznaczono spektrofotometrycznie (Cary 300, Varian) przy długości fali równej 535 nm, wobec próby odczynnikowej, składającej się z 1 ml kwasu TCA, 1 ml kwasu TBA oraz 0,5 ml buforu buforu TRIS-HCl, pH=7,4. Procent inhibicji utleniania liposomów obliczano na podstawie wzoru:

$$\% \text{ inhibicji} = \frac{\Delta A_0 - \Delta A_A}{\Delta A_0} \cdot 100\%,$$

gdzie: ΔA_0 - przyrost absorbancji próby kontrolnej po 30 minutach inkubacji, ΔA_A - przyrost absorbancji próby badanej w obecności przeciwutleniaczy [Leonhardt i wsp. 1997, Erlejman i wsp. 2004].

b) Fe^{2+} /askorbinian

Zawiesinę liposomów (1,5 mg/ml lipidu EYPC, w buforze 50 mM TRIS-HCl, pH=7,4) otrzymanych według procedury 4.4.1.a zmieszano z odpowiednią ilością: 5 mM wodnego roztworu askorbinianu, przeciwutleniacza oraz induktora utleniania – 1 mM wodnego roztworu żelaza. Objętość końcowa próby wynosiła 3 ml. Do próby kontrolnej dodawano odpowiednią ilość samego rozpuszczalnika przeciwutleniaczy. 0,5 ml próby kontrolnej (dla czasu $t = 0$ min pobieranej przed dodaniem induktora

utleniania) dodawano do 2 ml mieszaniny kwasu TBA z kwasem TCA (1:1, v/v), inkubowano przez 15 min w temperaturze 100 °C a następnie wirowano przez 15 min przy 2500 obr/min w temperaturze pokojowej. Do prób badanych dodawano odpowiednią ilość 1 mM roztworu $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$. Stosunek molowy jonów żelaza do askorbinianu wynosił 1:5 (n/n) [Minotti i Aust 1987, Auroma i wsp. 1989, Tang i wsp. 1997]. Badane próby w obecności jonów żelaza oraz przeciwutleniaczy inkubowano 30 min w ciemności w temperaturze 37 °C. Po inkubacji pobierano z próby 0,5 ml i dodawano 2 ml mieszaniny kwasu TBA z kwasem TCA (1:1, v/v). Postępowano identycznie jak z próbami kontrolnymi. Dla wszystkich odwirowanych prób stężenie powstałego barwnego adduktu dialdehydu malonowego z kwasem TBA oznaczono spektrofotometrycznie (Cary 300, Varian) przy długości fali równej 535 nm, wobec próby odczynnikowej. Próba odczynnikowa składała się z 1 ml kwasu TCA, 1 ml kwasu TBA oraz 0,5 ml buforu buforu TRIS-HCl, pH=7,4. Procent inhibicji utleniania liposomów obliczano na podstawie wzoru zamieszczonego w podpunkcie 4.4.3.a.

c) promieniowanie UVC

Próbkę zawierającą zawiesinę liposomów EYPC (1,5 mg/ml lipidu w buforze 50 mM TRIS-HCl, pH=7,4) z odpowiednią ilością ekstraktów roślinnych lub flawonoidów oraz odpowiednią ilością rozpuszczalnika naświetlano promieniowaniem UVC. Objętość końcowa próby wynosiła 3 ml. 0,5 ml próby kontrolnej dla czasu $t = 0$ minut (T_0) pobrano przed naświetlaniem i dodawano do mieszaniny 1 ml kwasu TBA i 1 ml kwasu TCA (1:1, v/v). Próby kontrolne inkubowano przez 15 min w temperaturze 100 °C, wirowano przez 15 min w temperaturze pokojowej przy 2500 obr/min. Badane próby naświetlano promieniowaniem UVC ($\lambda = 253,7 \text{ nm}$) przez 30 min. Strumień energii na poziomie powierzchni próbki wynosił $3,5 \text{ mW/cm}^2$. Odwirowane próby traktowano podobnie jak w przypadku utleniania indukowanego związkiem AAPH i jonami Fe^{2+} /askorbinian [Paiva-Martins i wsp. 2003].

Próby kontrolne zamiast przeciwutleniacza zawierały odpowiednią ilość rozpuszczalnika. Próby T_0 są to próby pobrane w chwili początkowej ($t=0$) służące do skorygowania poziomu procesu autooksydacji. Parametr IC_{50} wyznaczano na podstawie wykresów zależności procentu inhibicji utleniania lipidów od stężenia badanych przeciwutleniaczy. Wartość parametru IC_{50} wyraża stężenie przeciwutleniacza hamującego w 50 % proces utleniania liposomów. Aktywność przeciwutleniającą

wyrażano także jako ekwiwalent Troloksu (ang. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity – TEAC) w mM Troloksu w przeliczeniu na 100 g świeżej masy surowca [mM TE/100g ś.m.]. Troloks jest rozpuszczalnym w wodzie analogiem witaminy E, jego strukturę przedstawiono na rysunku 40.

Wartości TEAC uzyskano na podstawie krzywych kalibracyjnych wykonanych dla Troloksu, w analogicznych do wyżej opisanych doświadczeń, w których zastosowanym przeciwutleniaczem był Troloks (załącznik 1).

4.4.4 Gaszenie wolnych rodników DPPH•

Do metanolowego roztworu DPPH• (o absorbancji ok. 0,9) dodawano odpowiednią ilość ekstraktów roślinnych lub flawonoidów. Po 15 min zmierzono obniżenie absorbancji przy długości fali równej 517 nm [Brand-Williams i wsp. 1995]. Procent redukcji DPPH• przez przeciwutleniacze wyznaczano na podstawie następującej zależności:

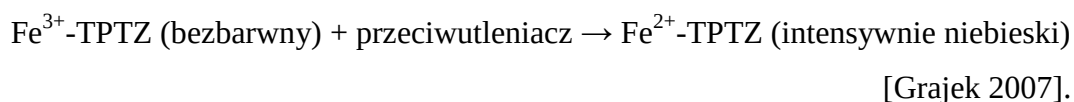
$$\% \text{ redukcji } DPPH^{\bullet} = \left(\frac{\Delta A_{0A}}{A_0} - 1 \right) \cdot 100\%,$$

gdzie: ΔA_{0A} - obniżenie absorbancji próby przy długości fali 517 nm po 15 minutach inkubacji DPPH• z przeciwutleniaczem, A_0 - wartość absorbancji DPPH• przy długości fali równej 517 nm w chwili początkowej $t = 0$ min pod nieobecność przeciwutleniacza. Strukturę rodnika DPPH• oraz schemat reakcji jego redukcji w obecności przeciwutleniacza przedstawiono na rysunku 41. Forma rodnikowa (o barwie fioletowej mająca maksimum przy długości fali równej 517 nm) w obecności przeciwutleniacza ulega redukcji do formy nierodnikowej o zabarwieniu żółtym. Malejąca absorbancja jest oznaką redukcji rodnika DPPH•.

Aktywność przeciwordnikową wyrażano jako ekwiwalent Troloksu (ang. Trolox Equivalent Antiradical Activity - TEAA) w mM Troloksu w przeliczeniu na 100 g świeżej masy surowca [mM TE/100g ś.m.], na podstawie krzywej kalibracyjnej dla Troloksu (załącznik 2), uzyskanej w analogicznym doświadczeniu, gdzie zastosowanym przeciwutleniaczem był Troloks.

4.4.5 Oznaczanie zdolności do redukowania jonów żelaza – FRAP

Zdolność ekstraktów polifenolowych oraz flawonoidów do redukowania jonów żelaza oznaczano przy użyciu metody FRAP (ang. Ferric Reducing Antioxidant Power) opisanej przez Benzie i Strain [1996]. Metoda FRAP polega na redukcji związku TPTZ (kompleks żelazowo-2,4,6-tripirydylo-S-triazyny) pod wpływem działania przeciwutleniacza według reakcji:



300 μl świeżo przygotowanego odczynnika FRAP (0,3 M buforu octowego, pH = 3,6; 10 mM TPTZ w 40 mM HCl, 20 mM FeCl_3) podgrzano do 37 °C, dodano 10 μl próby i wirowano. Absorbencję niebieskiego kompleksu Fe^{2+} -TPZT mierzono po 10 min inkubacji przy długości fali równej 595 nm. Wyniki wyrażano w ekwiwalencie μM Troloksu w przeliczeniu na 1 g świeżej masy surowca [μM TE/g ś.m.]. Krzywą standardową dla metanolowego roztworu Troloksu zamieszczono w załączniku 3. Odczynniki przygotowano w dniu doświadczenia.

4.4.6 Określanie całkowitej zawartości polifenoli

Określanie całkowitej zawartości polifenoli w ekstraktach roślinnych przeprowadzono metodą Folina-Ciocalteu. Zmieszano 100 μl odpowiednio rozcieńczonego roztworu ekstraktu polifenolowego z 200 μl odczynnikiem Folina-Ciocalteu. Mieszaninę inkubowano w ciemności przez 3 min. Po inkubacji dodawano 2 ml wody destylowanej, 1 ml 20% Na_2CO_3 i ponownie inkubowano przez 1 godzinę w ciemności. Próba odczynnikowa zawierała rozpuszczalnik ekstraktów. Wszystkie próby odwirowano przez 10 min przy 3000 obr/min w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu zmierzono absorbancję prób (Cary 300, Varian) przy długości fali równej 750 nm. Wyniki wyrażano jako ekwiwalent kwasu galusowego (mg) w przeliczeniu na 100g świeżej masy surowca [mg GAE/100g ś.m.] [Gao i wsp. 2000, Benvenuti i wsp. 2004]. Krzywą standardową dla wodnego roztworu kwasu galusowego (rys. 42) przygotowano w identycznych warunkach jak w przypadku prób badanych. Krzywą standardową dla kwasu galusowego zamieszczono w załączniku 4.

4.4.7 Określanie całkowitej zawartości flawonoidów

Do 1 ml roztworu ekstraktu polifenolowego w odpowiednim stężeniu dodawano 1 ml metanolowego roztworu 2% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Po 10 min mieszania zmierzono absorbancję przy długości fali równej 430 nm (Cary 300, Varian). Wyniki wyrażano w równoważniku rutyny (mg) w przeliczeniu na 100g świeżej masy surowca [mg RE/100g ś.m.] na podstawie krzywej standardowej dla rutyny (rys. 43) [Zhishen i wsp. 1999]. Krzywą standardową dla rutyny (załącznik 5) przygotowano w identycznych warunkach jak w przypadku prób badanych.

4.4.8 Określanie zawartości antocyjanów

Metoda oznaczenia zawartości antocyjanów polega na pomiarze absorbancji antocyjanów w świetle widzialnym w roztworach buforowych o dwóch wartościach pH. Zmiana absorbancji związana jest ze zmianami strukturalnymi antocyjanów (rys. 44).

W pH=1,0 antocyjany przyjmują postać kationu flawyliowego o czerwonej barwie. W pH=4,5 następuje przekształcenie ich formy w bezbarwną pseudozasadę (rys. 45) [Grajek 2007].

W celu oznaczenia zawartości antocyjanów przygotowano dwa bufony. Bufor chlorku potasu 0,025 M, pH=1,0, sporządzano poprzez rozpuszczenie 1,86 g KCl w 980 ml wody destylowanej. Mieszaninę doprowadzano przy użyciu HCl do pH=1,0 i uzupełniano do objętości 1l. Roztwór octanu sodu 0,4M, pH=4,5, przygotowano poprzez rozpuszczenie 54,43 g $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ w 960 ml wody destylowanej. Przy użyciu HCl roztwór doprowadzano do pH=4,5 i uzupełniano do objętości 1 l. Badane próby przygotowano oddzielnie z każdym buforem i inkubowano przez 15 min. Pomiar absorbancji wykonywano przy użyciu spektrofotometru Cary 300, Varian przy dwóch długościach fali $\lambda = 520 \text{ nm}$ oraz $\lambda = 700 \text{ nm}$. Zawartość antocyjanów wyrażano w równoważniku cyjanidyno-3-galaktozydu (mg) w przeliczeniu na 100 g świeżej masy surowca [mg C3GE/100g ś.m.] [Giusti i Wrolstad 2001, Benvenuti i wsp. 2004].

4.4.9 Chelatowanie jonów żelaza

Zdolność ekstraktów polifenolowych z berberysu, derenia, mahonii oraz flawonoidów: cyjanidyny i cyjanidyno-3-galaktozyd do kompleksowania jonów metali przeprowadzano metodą spektrofotometryczną. Przygotowano 2 mM roztwór $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Do kuwet pomiarowych dodawano 2 ml roztworów ekstraktów polifenolowych lub flawonoidów i miareczkowano roztworem żelaza.

W przypadku ekstraktów roślinnych stężenie wyjściowe wynosiło 0,03 g/ml, natomiast w przypadku flawonoidów 0,1 mM. Roztwory przeciwutleniaczy miareczkowano następującymi objętościami roztworu żelaza: 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 i 400 μ l. Maksymalne stężenie jonów żelaza wynosiło 0,33 mM. Próba odczynnikowa zawierała 2 ml metanolu. Pomiary wykonywano przy użyciu spektrofotometru Cary 300, Varian w zakresie fal od 250 nm do 700 nm w temperaturze pokojowej. Za umownie przyjęty parametr kompleksowania przyjęto przesunięcie hiperchromowe (ΔA) oraz batochromowe ($\Delta \lambda$) odpowiednich maksimów w elektronowych widmach absorpcyjnych ekstraktów oraz flawonoidów miareczkowanych roztworem $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$.

4.4.10 Wyznaczanie współczynników podziału pomiędzy oktanol i wodę (P)

Współczynniki podziału ekstraktów polifenolowych oraz flawonoidów pomiędzy oktanol i wodę wyznaczano według metody opisanej przez Nenadis i wsp. [2003]. 3 ml oktanolu wraz z odpowiednią ilością ekstraktu polifenolowego lub flawonoidu inkubowano w 37 °C przez 30 min. Wykonywano widma UV-vis (Cary 300, Varian). Odczytano absorbancję przy maksymalnej długości fali - A_0 . Do oktanolu dodawano wodę destylowaną (1:1, v/v). Mieszano przez minutę przy użyciu wytrząsarki (2500 rpm). Próby wirowano przy 1500 g przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po 30 minutach inkubacji wykonywano widmo UV-vis fazy organicznej (A_x). Roztwór oktanolu zmieszanego z wodą destylowaną (1:1, v/v) stanowił próbę odniesienia. Współczynnik podziału P obliczano na podstawie wzoru:

$$P = \frac{A_x}{A_0 - A_x}.$$

4.4.11 Wyznaczanie stałych dysocjacji w układzie liposomy EYPC : bufor

Stałe dysocjacji ekstraktów roślinnych oraz flawonoidów do błon liposomów wyznaczano na podstawie zmodyfikowanej procedury opisanej przez Tammela i wsp. [2004]. Metoda polega na pomiarze gaszenia fluorescencji hydrofobowej sondy 1,6-di-fenilo-1,3,5-heksatrienu - DPH.

Liposomy sonifikowane przygotowano według procedury opisanej w punkcie 4.4.2. Do kuwet pomiarowych dodawano 0,3 ml otrzymanej zawiesiny liposomów (stężenie

EYPC wynosiło 1 mg/ml) oraz 2,2 ml buforu fosforanowego A, pH=7,4. Pomiaru fluorescencji sondy wykonywano przy użyciu spektrofluorymetru SFM-25, Kontron Instruments, Zürich, Switzerland, w temperaturze pokojowej. Długości fali wzbudzenia λ_{ex} i emisji λ_{em} wynosiły odpowiednio: 360 nm i 425 nm. Stałe dysocjacji wyznaczano na podstawie równania Sterna-Volmera, przedstawiającego zależność pomiędzy intensywnością fluorescencji sondy DPH w funkcji stężenia badanych przeciwutleniaczy:

$$\frac{1}{(F_0/F)-1} = \frac{K_d}{[EYPC]} \cdot \frac{1}{[Sub]} + \frac{1}{[EYPC]},$$

gdzie: F_0 i F - intensywność fluorescencji próby odpowiednio bez i z przeciwutleniaczem, $[EYPC]$ - stężenie fosfatydylocholiny w próbce w mg/ml, $[Sub]$ - stężenie badanego ekstraktu polifenolowego w mg/ml lub flawonoidu w mol/l. Z liniowej zależności $1/[(F_0/F) - 1] = f(1/[Sub])$ wyznaczano współczynnik nachylenia prostej, a następnie obliczano stałą K_d . Ekstrakty polifenolowe oraz flawonoidy rozpuszczano w buforze fosforanowym A, pH=7,4.

4.4.12 Badania wpływu karboksyfluoresceiny (CF)

Do pomiaru wycieku karboksyfluoresceiny z liposomów wykorzystywano zjawisko samowygaszania fluorescencji barwnika gdy znajduje się on w roztworze w odpowiednio wysokim stężeniu. 5(6)-karboksyfluoresceina (CF) zamknięta w liposomach, w stężeniu 100-200 mM, praktycznie nie fluoryzuje. Cała obserwowana fluorescencja zawiesiny liposomów pochodzi od cząsteczek fluoroforu uwolnionych z wnętrza pęcherzyków do środowiska. Właściwości te stały się podstawą w badaniach między innymi stabilności liposomów oraz określania ich objętości zamknięcia [Kozubek 2004].

Pomiary wpływu CF wykonywano na podstawie zmodyfikowanej procedury opisanej przez Yokoyama i wsp. [2002]. Pęcherzyki lipidowe przygotowano według procedury 4.4.1a. Lipidy, z których formowano liposomy różniły się długością łańcucha acylowego oraz liczbą wiązań nienasyconych w łańcuchu. Po odparowaniu chloroformu z 5 mg lipidu, suchy film lipidowy hydratowano w 0,5 ml roztworu karboksyfluoresceiny 146 mM w buforze TRIS-HCl, pH=7,4. Dla dokładnego rozpuszczenia CF w buforze dodawano porcjami 45 μ l roztworu NaOH. Otrzymaną

zawiesinę ogrzewano powyżej temperatury przejścia fazowego lipidów (T_{pf}). Wytrząsano i sonifikowano, również powyżej T_{pf} przez 5 minut lub kalibrowano przeciskając przez filtry poliwęglanowe o wielkości porów 100 nm w ekstruderze ręcznym. Próby przeciskano 30-krotnie dla zapewnienia odpowiedniej homogenności. Niezamknięty w liposomach barwnik oddzielano poprzez sączenie molekularne na kolumnie (1 cm x 15 cm) wypełnionej żelą Sephadex G-50 zrównoważonym buforem TRIS-HCl, pH=7,4. Zebraną zawiesinę liposomów rozcieńczano 5-krotnie buforem TRIS-HCl, pH=7,4. W kuwecie pomiarowej umieszczano 50 μ l rozcieńczonych liposomów z CF i uzupełniano do 2,5 ml buforem TRIS-HCl, pH=7,4. Pomiar wykonywano przy użyciu spektrofлуorymetru SFM-25, Kontron Instruments, Zürich, Switzerland w temperaturze pokojowej. Długość fali wzbudzenia wynosiła 490 nm, natomiast fali emisji 520 nm. Po 15 minutach liposomy niszczone poprzez dodanie 20 μ l 10% Tritonu X-100. Procentowy wpływ CF z liposomów obliczano na podstawie wzoru:

$$\text{wpływ CF [\%]} = \frac{F_t - F_0}{F_{Tx} - F_0} \cdot 100\%,$$

gdzie: F_t - fluorescencja próby po czasie t , F_0 - fluorescencja próby w chwili początkowej $t = 0$ minut, F_{Tx} oznacza fluorescencję końcową próby po 15 minutach inkubacji, po destrukcji liposomów poprzez dodanie Tritonu [Sandström i wsp. 2005].

4.4.13 Pomiar efektywności zamykania karboksyfluoresceiny (CF)

Do pomiaru efektywności zamykania CF w liposomach wykorzystano pomiar wpływu karboksyfluoresceiny opisany w podpunkcie 4.4.12. Pęcherzyki lipidowe formowano z lipidów różniących się długością łańcucha oraz liczbą wiązań podwójnych w nim. Procentową efektywność zamykania CF obliczano na podstawie wzoru:

$$\text{efektywność zamykania CF [\%]} = \frac{F_{Tx} - F_0}{F_{total} - F_0} \cdot 100\%,$$

gdzie: F_0 - fluorescencja próby w chwili $t = 0$ minut, F_{Tx} oznacza fluorescencję końcową próby po 15 minutach inkubacji i po rozbiciu liposomów poprzez dodanie Tritonu, F_{total} - fluorescencja wyjściowego roztworu CF.

4.4.14 Badania rozmiarów liposomów

Do analizy rozkładu wielkości liposomów zastosowano aparat Zetasizer Nano-ZS firmy Malvern. Zetasizer Nano-ZS działa na zasadzie dynamicznego rozproszenia światła (ang. dynamic light scattering - DLS), czyli modulowania częstotliwości światła rozproszonego poprzez własny ruch rozpraszających cząsteczek (np. ruchy Browna). Aparat ten określa średnią wielkość liposomów w funkcji ich objętości.

4.4.15 Badania anizotropii fluorescencji sondy DPH

W badaniach płynności błon liposomów wykorzystano pomiar zmian względnej anizotropii fluorescencji sondy 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrienu (DPH). Liposomy przygotowano według procedury opisanej w punkcie 4.4.2. Do kuwet pomiarowych dodawano 0,3 ml otrzymanej zawiesiny liposomów z sondą, oraz 2,2 ml buforu fosforanowego A, pH=7,4. Stężenie końcowe lipidu wynosiło 200 μ M, a sondy DPH 5 μ M. Pomiar anizotropii fluorescencji sondy wykonywano przy użyciu spektrofлуorymetru Varian Cary Eclipse w temperaturze pokojowej. Długości fali wzbudzenia λ_{ex} oraz fali emisji λ_{em} wynosiły odpowiednio: 360 nm oraz 425 nm, szczelina 5 nm. Anizotropię fluorescencji sondy (A) wyznaczano z równania:

$$A = \frac{I_{II} - I_{+}}{I_{II} + 2I_{+}},$$

gdzie: I_{II} , I_{+} - natężenie światła przechodzącego przez analizator zorientowany równolegle lub prostopadle do kierunku polaryzacji światła wiązki wzbudzającej [Lakowicz 1999].

4.4.16 Wpływ ekstraktów roślinnych oraz flawonoidów na anizotropię sondy TMA-DPH

W badaniach wpływu ekstraktów polifenolowych oraz flawonoidów na płynność błon liposomów z DPPC wykorzystano sondę TMA-DPH. Sonifikowane

pęcherzyki lipidowe przygotowano według procedury opisanej w punkcie 4.4.2. Do kuwet pomiarowych dodano 0,3 ml otrzymanej zawiesiny liposomów z sondą, oraz 2,2 ml buforu fosforanowego A, pH=7,4. Stężenie lipidu w kuwecie wynosiło 0,12 mg/ml. Pomiary anizotropii fluorescencji sondy wykonywano przy użyciu spektrofлуorymetru Varian Cary Eclipse w temperaturze pokojowej. Długości fali wzbudzenia λ_{ex} oraz fali emisji λ_{em} wynosiły odpowiednio: 358 nm oraz 428 nm, szczelina 5 nm. Ekstrakty polifenolowe przygotowano w mieszaninie etanolu z buforem A, pH=7,4. Flawonoidy rozpuszczono w buforze fosforanowym A, pH=7,4. Badane związki dodawano do kuwet i inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 20 min. Wyniki przedstawiono jako zależność względnej zmiany anizotropii fluorescencji sondy od stężenia badanych związków. Względną zmianę anizotropii fluorescencji TMA-DPH obliczano ze wzoru:

$$\text{względna zmiana anizotropii fluorescencji [\%]} = \frac{A - A_0}{A_0} \cdot 100\%,$$

gdzie: wartości A oznaczają anizotropię fluorescencji sondy w obecności ekstraktu roślinnego lub flawonoidu, natomiast A_0 anizotropię fluorescencji bez ekstraktów polifenolowych oraz flawonoidów.

4.4.17 Badania efektywności zamykania przeciwutleniaczy w nośnikach liposomowych FAT-s

W badaniach efektywności zamykania przeciwutleniaczy zastosowano liposomy uformowane z lipidów różniących się długością łańcucha acylowego bez oraz z dodatkiem 40 mol % cholesterolu. Do utworzenia liposomowych nośników zastosowano nowatorską metodę polegającą na poddaniu pęcherzyków lipidowych otrzymanych w wyniku cyklicznego zamrażania i rozmrażania (FAT) następnie ich sonifikowaniu (FAT-s). Lipidy odparowano w atmosferze azotu oraz osuszono w eksykatorze przez 3 godziny. Przeciwutleniacze dodawano, w zależności od ich powinowactwa do błony lipidowej, na różnym etapie tworzenia nośników liposomowych. Dodawano 0,5 ml roztworu EGCG, epikatechiny rozpuszczonego w buforze TRIS-HCl, pH=7,4. Kwercetynę (25 μ l) dodawano po hydratacji filmu lipidowego w 0,5 ml buforem TRIS-HCl. 25 μ l roztworu zielonej herbaty lub arniki dodawano po 30 min odparowania do suchego filmu lipidowego, a następnie

dodatkowo suszono przez 30 minut i dodawano bufor TRIS-HCl. Epikatechinę, EGCG, ekstrakt z arniki oraz zielonej herbaty rozpuszczano w mieszaninie etanolu z buforem TRIS-HCl, pH=7,4 (1:3, v/v). Kwercetynę rozpuszczano w etanolu. Stężenie flawonoidów wynosiło 1 mM, z wyjątkiem kwercetyny dla której zastosowano roztwór 6 mM, natomiast w przypadku ekstraktów polifenolowych wynosiło 10 mg/ml.

Do prób odniesienia dodawano 0,5 ml buforu TRIS-HCl, pH=7,4. Próby inkubowano w temperaturze powyżej temperatury przejścia fazowego lipidów. Czas inkubacji wynosił 15 minut. Podczas inkubacji wytrząsano próby przy pomocy wytrząsarki. Próby poddano dziesięciokrotnemu cyklowi zarażania w ciekłym azocie i rozmrażania powyżej temperatury przejścia fazowego lipidów otrzymując liposomy FAT o zwiększonej efektywności zamykania. Próby sonifikowano przez 5 minut. Uzyskano liposomy FAT-s. Otrzymaną zawiesinę pęcherzyków lipidowych nanoszono na kolumny (0,5 cm x 10 cm) wypełnione żelą Sephadex G-50 zrównoważonym buforem TRIS-HCl, pH=7,4, dla oddzielenia niezamkniętych cząsteczek ekstraktów polifenolowych lub flawonoidów. Zmierzono absorbancję rozcieńczonej frakcji przy długości fali $\lambda_{\max}$ dla danego przeciwutleniacza oraz dla 450 nm w celu ujednolicenia stężenia lipidu. Dla próby kontrolnej zmierzono absorbancję przy fali $= \lambda_{\max}$ dla danego przeciwutleniacza oraz dla długości 450 nm. Próbę kontrolną, zawierającą tylko zawiesinę pęcherzyków lipidowych, otrzymano w identyczny sposób jak liposomy z zamkniętymi substancjami. Dla przeciwutleniaczy, które były zamykane w liposomach wykonano krzywe standardowe na podstawie których wyliczono ich stężenie w nośnikach liposomowych, a następnie % ich zamykania. Krzywe standardowe zamieszczono w załączniku 6.

4.4.18 Obliczenia statystyczne

Dane do obliczeń statystycznych pochodziły z co najmniej trzech pomiarów. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy wykorzystaniu programu STATISTICA 9.0. Ocenę istotności różnic pomiędzy średnimi wykonywano za pomocą testu Duncana. Założono poziom istotności $\alpha = 0,05$. Grupy jednorodne oznaczono w tabelach w załącznikach.

5 WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki badań zamieszczone w niniejszej pracy ujęto w cztery grupy.

Pierwsza i druga grupa badań dotyczy odpowiednio aktywności przeciwutleniającej roślinnych ekstraktów polifenolowych i flawonoidów. Trzecia grupa badań obejmuje właściwości fizyczne liposomów, uformowanych z lipidów różniących się długością łańcucha oraz liczbą wiązań podwójnych w łańcuchu acylowym. Czwarta część badań, dotyczy liposomowego nośnika przeciwutleniaczy.

Wyniki z pierwszej i drugiej grupy badań pozwoliły na ustalenie, które z badanych ekstraktów i flawonoidów są najbardziej aktywne przeciwutleniająco, oraz jaki jest prawdopodobny mechanizm ich działania wobec wolnych rodników. Wyniki te wskazały również, które z badanych ekstraktów oraz flawonoidów posiadają powinowactwo do liposomów, co pozwoliło na ich skuteczne zamykanie w liposomach jako potencjalnych nośnikach.

5.1 Ekstrakty polifenolowe

5.1.1 Pomiar inhibicji utleniania liposomów EYPC w obecności ekstraktów polifenolowych –TBARS

Zbadano aktywność przeciwutleniającą metanolowych ekstraktów z berberysu, derenia, mahonii, ogórecznika, arniki oraz zielonej herbaty wobec błon liposomów EYPC testem TBARS. Utleniania lipidów indukowano trzema czynnikami: związkiem AAPH, jonami Fe^{2+} /askorbinian oraz promieniowaniem UVC. Wyniki wyrażono parametrem IC_{50} w [mg/ml] (ang. inhibition concentration) i przedstawiono na rysunkach 46a i 46b. Parametr IC_{50} jest powszechnie stosowany dla porównania aktywności przeciwutleniającej związków. Wyraża on stężenie przeciwutleniacza hamujące w 50% proces peroksydacji. Mniejsza wartość IC_{50} oznacza wyższą aktywność przeciwutleniającą.

Z rysunku 46a wynika, że badane ekstrakty wykazały bardzo zróżnicowaną aktywność przeciwutleniającą w stosunku do błon liposomów EYPC poddanych peroksydacji. Berberys wykazał wysoką aktywność przeciwutleniającą jedynie gdy utleniania indukowano związkiem AAPH ($\text{IC}_{50} = 0,14 \pm 0,01$ mg/ml). Ekstrakt z berberysu wykazał natomiast zdecydowanie słabsze właściwości przeciwutleniające gdy peroksydację lipidów indukowano jonami Fe^{2+} /askorbinian ($\text{IC}_{50} = 1,50 \pm 0,05$

mg/ml) oraz promieniowaniem UVC ($IC_{50} = 2,69 \pm 0,04$ mg/ml). Najniższą aktywność spośród wszystkich badanych ekstraktów, za wyjątkiem utleniania indukowanego jonami Fe^{2+} /askorbinian, wykazał ekstrakt z derenia, o czym świadczą wysokie wartości IC_{50} wynoszące odpowiednio: $1,13 \pm 0,01$ mg/ml (AAPH), $1,24 \pm 0,07$ mg/ml (Fe^{2+} /askorbinian) oraz $6,17 \pm 0,06$ mg/ml (UVC). Mahonia wykazała dobre właściwości chroniące błony liposomów EYPC przed peroksydacją indukowaną AAPH ($0,34 \pm 0,03$ mg/ml) oraz jonami Fe^{2+} /askorbinian ($0,29 \pm 0,01$ mg/ml). Wyniki te stanowiły jednorodną grupę. Około 10-krotnie słabszy wynik dla mahonii uzyskano w przypadku utleniania indukowanego promieniowaniem UVC ($IC_{50} = 2,35 \pm 0,10$ mg/ml). Dla ekstraktu z ogórecznika uzyskano najniższe wartości IC_{50} ($IC_{50} = 0,08 \pm 0,01$ mg/ml) w przypadku indukowania utleniania liposomów AAPH. W przypadku arniki oraz zielonej herbaty we wszystkich trzech badanych układach otrzymano niskie wartości IC_{50} . Wyniki wskazują, że ekstrakty z arniki oraz zielonej herbaty były najaktywniejszymi przeciwutleniająco ze wszystkich badanych ekstraktów polifenolowych. Dla arniki $IC_{50} = 0,02 \pm 0,1 \cdot 10^{-2}$ mg/ml (AAPH), $IC_{50} = 0,07 \pm 0,4 \cdot 10^{-2}$ mg/ml (Fe^{2+} /askorbinian) oraz $IC_{50} = 0,09 \pm 0,6 \cdot 10^{-2}$ mg/ml (UVC). Dla zielonej herbaty wartości parametrów tych wynosiły: $IC_{50} = 8,2 \cdot 10^{-3} \pm 2,2 \cdot 10^{-4}$ mg/ml (AAPH), $IC_{50} = 8,1 \cdot 10^{-3} \pm 2,0 \cdot 10^{-4}$ mg/ml (Fe^{2+} /askorbinian), $IC_{50} = 0,29 \pm 0,07$ mg/ml (UVC).

Opracowanie statystyczne wyników wykazało istotne statystycznie różnice w wartościach IC_{50} w przypadku ekstraktów z berberysu, derenia, ogórecznika oraz arniki w zależności od czynnika utleniającego. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w aktywności ekstraktów z mahonii oraz zielonej herbaty w utleniania liposomów AAPH oraz jonami Fe^{2+} /askorbinian. Próby należały do grupy jednorodnej (załącznik 7a).

Na podstawie wyników zamieszczonych na rysunku 46b wynika, że badane ekstrakty wykazały najwyższą aktywność wobec liposomów utleniania związkiem AAPH, natomiast niższą w układzie z jonami Fe^{2+} /askorbinian. Sposób utleniania błon liposomów EYPC okazał się istotnym czynnikiem w badaniu procesów inhibicji utleniania. Najniższą aktywność przeciwutleniającą wykazały badane ekstrakty roślinne, z wyjątkiem arniki, w przypadku indukcji peroksydacji błon promieniowaniem UVC. Arnika również w przypadku utleniania lipidów promieniowaniem UVC wykazała stosunkowo wysoką aktywność przeciwutleniającą ($IC_{50} = 0,09 \pm 0,6 \cdot 10^{-2}$ mg/ml). W przypadku utleniania błon promieniowaniem UVC wartości parametru IC_{50}

były najbardziej zróżnicowane. Szczegółowe wartości parametrów IC_{50} zamieszczono w załączniku 7b.

Dokonując statystycznego opracowania omówionych powyżej wyników stwierdzono, że rodzaj ekstraktu polifenolowego w znaczącym stopniu wpłynął na proces hamowania procesów peroksydacji. Wyjątek stanowiły ekstrakty z mahonii oraz ogórecznika w przypadku układu jonów Fe^{2+} /askorbinian, gdzie próby te należały do grupy jednorodnej.

Dla porównania aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów polifenolowych z aktywnością Troloksu przedstawiono je jako parametr TEAC (ang. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Wyniki wyrażono w ekwiwalencie Troloksu (mM) w przeliczeniu na 100 g świeżej masy surowca [mMTE/100g ś.m.] i przedstawiono na rysunkach 47a oraz 47b. Wyższa wartość parametru TEAC świadczy o silniejszych właściwościach przeciwutleniających ekstraktu roślinnego.

Na podstawie analizy danych zawartych na rysunku 47a stwierdzono, że najwyższą aktywność ochronną wobec utleniania błon liposomów związkiem AAPH oraz jonami Fe^{2+} /askorbinian wykazał ekstrakt z zielonej herbaty. Wartości parametrów TEAC wynosiły odpowiednio: $422,87 \pm 13,40$ mM TE/100g ś.m. oraz $132,00 \pm 1,34$ mM TE/100g ś.m.. Ekstrakt z arniki wykazał najwyższą wartość parametru TEAC = $157,21 \pm 8,13$ mM TE/100g ś.m. Wartość TEAC w przypadku peroksydacji błon liposomów EYPC jonami Fe^{2+} /askorbinian oraz promieniowaniem UVC wynosiła około 100 razy mniej w porównaniu z TEAC utleniania lipidów związkiem AAPH. Próby należały do jednorodnej grupy. Podobnie jednorodną grupę stanowiły próby gdy peroksydację indukowano jonami Fe^{2+} /askorbinian oraz promieniowaniem UVC w obecności ekstraktów z berberysu, derenia, arniki oraz ogórecznika. W pozostałych przypadkach czynnik utleniania był istotny statystycznie. Wyniki zamieszczono w załączniku 8a.

Dla zilustrowania różnic w aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów roślinnych, zależnej od sposobu utleniania liposomów, wyniki przedstawiono dodatkowo na rysunku 47b.

Podsumowując je stwierdzono następujące sekwencje zmian aktywności przeciwutleniającej:

- AAPH > jony Fe^{2+} /askorbinian > promieniowanie UVC,
- podczas utleniania związkiem AAPH: zielona herbata > arnika > ogórecznik > berberys > mahonia > dereń,

- podczas utleniania jonami Fe^{2+} /askorbinian: zielona herbata > arnika > ogórecznik > mahonia > dereń > berberys,
- podczas utleniania promieniowaniem UVC: arnika > zielona herbata > ogórecznik > mahonia > berberys > dereń.

Dokonując statystycznego opracowania wyników stwierdzono, że jedynie w przypadku utleniania związkiem AAPH rodzaj ekstraktu roślinnego w istotnym stopniu wpływał na poziom utleniania błon liposomów EYPC. W układzie z jonami Fe^{2+} /askorbinian ekstrakty z berberysu, derenia, mahonii oraz ogórecznika stanowiły grupy jednorodne. Pozostałe dwa ekstrakty, tj. z arniki oraz zielonej herbaty, stanowiły dwie różnorodne grupy. Wartości TEAC gdy liposomy EYPC naświetlano promieniowaniem UVC w obecności ekstraktów z berberysu, derenia, mahonii oraz ogórecznika należały do grupy jednorodnej. Ekstrakty z arniki oraz zielonej herbaty stanowiły odrębne grupy statystyczne. Szczegółowe dane zamieszczono w załączniku 8b.

5.1.2 Gaszenie wolnych rodników DPPH $\cdot$ przez ekstrakty roślinne

W celu zbadania aktywności przeciwrodnikowych ekstraktów polifenolowych wykorzystano doświadczenie polegające na wychwytywaniu wolnych rodników DPPH $\cdot$. Na rysunku 48 przedstawiono wartości parametru TEAA (ang. Trolox Equivalent Antiradical Activity) badanych ekstraktów wyrażone w ekwiwalencie Troloksu (mM) na 100 g świeżej masy surowca [mM TE/100g ś.m.].

Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku 48 oraz zawartych w załączniku 9 zauważono znaczące różnice w aktywności przeciwrodnikowej ekstraktów polifenolowych. Wartości TEAA malały zgodnie z następującą relacją: zielona herbata > arnika > ogórecznik > berberys > mahonia > dereń. Wartości parametrów TEAA mieściły się w zakresie od $1,96 \pm 0,02$ mM TE/100g ś.m. dla derenia do $229,33 \pm 16,26$ mM TE/100g ś.m. dla zielonej herbaty. Dokonując analizy statystycznej omówionych powyżej wyników stwierdzono, że ekstrakty z zielonej herbaty, arniki oraz ogórecznika w sposób istotny wpłynęły na zawartość wolnych rodników DPPH $\cdot$. Ekstrakty z berberysu, derenia oraz mahonii należały do jednorodnej grupy statystycznej.

5.1.3 Oznaczanie zdolności ekstraktów polifenolowych do redukowania jonów żelaza – FRAP

Metoda FRAP służy do oznaczenia aktywności przeciwutleniającej substancji, w tym ekstraktów polifenolowych, poprzez zdolność tych związków do redukowania jonów żelaza Fe^{3+} , zawartych w odczynniku TPTZ, do jonów Fe^{2+} .

Wartości FRAP (rysunek 49, załącznik 9) wskazują znaczne różnice w zdolności do redukowania jonów żelaza przez badane ekstrakty. Najniższą wartość parametru FRAP, czyli najniższą zdolność do redukowania jonów żelaza, wykazały ekstrakty z mahonii ($12,37 \pm 0,42 \mu\text{M TE/1g ś.m.}$), derenia ($13,81 \pm 0,60 \mu\text{M TE/1g ś.m.}$) oraz berberysu ($20,09 \pm 0,88 \mu\text{M TE/1g ś.m.}$), należące do jednorodnej grupy statycznej. Około 100 razy wyższą aktywność wykazał ekstrakt z ogórecznika ($132,96 \pm 6,09 \mu\text{M TE/1g ś.m.}$). Ekstrakt z arniki miał około dwa razy wyższą aktywność przeciwutleniającą w porównaniu z ekstraktem z ogórecznika ($330,50 \pm 13,12 \mu\text{M TE/1g ś.m.}$). Najwyższą zdolność do redukowania jonów żelaza, czyli najwyższą aktywność przeciwutleniającą, wykazała zielona herbata. Wartość FRAP dla ekstraktu z zielonej herbaty wynosiła $2794,74 \pm 76,77 \mu\text{M TE/1g ś.m.}$. Ekstrakty z ogórecznika, arniki oraz zielonej herbaty stanowiły odrębne grupy statystyczne.

5.1.4 Określanie całkowitej zawartości polifenoli w ekstraktach roślinnych

Całkowitą zawartość polifenoli w ekstraktach roślinnych określano metodą Folina-Ciocalteu. Wyniki wyrażone w ekwiwalencie kwasu galusowgo (mg) w przeliczeniu na 100 g świeżej masy surowca [mg GAE/100g ś.m.] zamieszczono na rysunku 50 oraz w załączniku 10. Analizując dane zauważono, że całkowita zawartość polifenoli malała zgodnie z następującą relacją: zielona herbata > arnika > ogórecznik > berberys > mahonia > dereń. Zawartość polifenoli w tych ekstraktach wahała się w szerokim zakresie od $37964,52 \pm 1713,96 \text{ mg GAE/100g ś.m.}$ dla zielonej herbaty do $339,36 \pm 4,59 \text{ mg GAE/100g ś.m.}$ dla derenia. Ekstrakty z berberysu, derenia oraz mahonii nie różniły się znacząco między sobą zawartością polifenoli (próby należały do jednorodnej grupy). Zawartość polifenoli dla pozostałych trzech ekstraktów różniła się znacząco - prawie 100-krotnie. Przynależność próbek do grupy jednorodnej w przypadku berberysu i mahonii mogła wynikać z przynależności do jednej rodziny: berberysowatych.

5.1.5 Określanie całkowitej zawartości flawonoidów w ekstraktach roślinnych

W metodzie spektrofotometrycznej określania całkowitej zawartości flawonoidów wykorzystano zdolność flawonoidów do kompleksowania jonów Al^{3+} . Wyniki zawartości flawonoidów wyrażone w ekwiwalencie rutyny (mg) w przeliczeniu na 100 g świeżej masy surowca [mg RE/100g ś.m.] przedstawiono na rysunku 51 oraz zebrano w załączniku 10.

Zawartość flawonoidów w poszczególnych ekstraktach roślinnych malała w następującym porządku: zielona herbata > arnika > ogórecznik > berberys > mahonia > dereń. Ekstrakt z zielonej herbaty, najbogatszy we flawonoidy ($5723,18 \pm 285,09$ mg RE/100g ś.m.), posiadał ich około 100-krotnie więcej w porównaniu z ilością flawonoidów zawartych w dereniu ($63,86 \pm 3,04$ mg RE/100g ś.m.). Berberys, dereń oraz mahonia stanowiły jednorodną grupę statystyczną. Ogórecznik, arnika oraz zielona herbata należały do różnorodnych grup.

5.1.6 Określanie zawartości antocyjanów w ekstraktach roślinnych

Metoda oznaczania antocyjanów w ekstraktach roślinnych wykorzystuje zależność tych związków od pH środowiska w którym się znajdują. W wyniku zmian pH następują transformacje struktury cząsteczkowej antocyjanów, co wpływa na ich barwę.

Zawartości antocyjanów, wyrażone w ekwiwalencie cyjanidyno-3-galaktozydu (mg) w przeliczeniu na 100 g świeżej masy surowca [mg C3GE/100g ś.m.], w ekstraktach z berberysu, derenia oraz mahonii przedstawiono na rysunku 52.

Analizując dane z rysunku 52 stwierdzono, że berberys oraz dereń nie różniły się znacząco ilością antocyjanów (próby stanowiły jednorodną grupę). Zawartość antocyjanów w tych owocach wynosiła około 50 mg C3GE/100g ś.m. W mahonii zawartość antocyjanów była natomiast ponad 40-krotnie wyższa ($226,63 \pm 4,46$ mg C3GE/100g ś.m.). Zauważono, że barwy owoców berberysu (rys. 27) i derenia (rys. 31) były do siebie zbliżone. Owoce mahonii były wyraźnie ciemniejsze (rys. 33), co świadczy o wyższej zawartości antocyjanów. Szczegółowe wyniki zebrano w załączniku 10.

5.1.7 Chelatowanie jonów żelaza przez ekstrakty roślinne

Widma absorpcyjne metanolowych roztworów ekstraktu z berberysu, derenia oraz mahonii miareczkowanych jonami Fe^{2+} przedstawiono na rysunku 53.

Widma ekstraktów w miarę miareczkowania kolejnymi porcjami roztworu 2 mM FeCl_2 Widma te posiadały charakterystyczne dla antocyjanów maksima przy długości fali równej około 530 nm oraz pasma pochodzące od ich kompleksu z jonami Fe^{2+} w zakresie od 550 - 650 nm. W opisie procesu kompleksowania cząsteczek przyjętymi parametrami zostały wartości przyrostu absorbancji pików pochodzącego od kompleksu ($\Delta A_{\text{kompleks}}$), oraz zmniejszenia absorbancji pików pochodzącego od badanych ekstraktów roślinnych ($\Delta A_{\text{ekstrakt}}$), a także przesunięcie batochromowe ($\Delta \lambda$), czyli przesunięcie pików pochodzącego od flawonoidu w kierunku fal dłuższych. Wartości tych parametrów zamieszczono w tabeli 8.

EKSTRAKT	PRZESUNIĘCIA HIPERCHROMOWE (ΔA) ORAZ BATOCHROMOWE ($\Delta \lambda$) MAKSYMUM PIKU		
	$\Delta A_{\text{ekstrakt}}$	$\Delta A_{\text{kompleks}}$	$\Delta \lambda$ [nm]
berberys / Fe	0,08↓	0,02↑	0*
dereń / Fe	1,04↓	0*	2
mahonia / Fe	1,41↓	0,03↑	3

Tab. 8. Wartości przesunięć hiperchromowych (ΔA) oraz batochromowych ($\Delta \lambda$) [nm] maksimum pików absorbancji badanych ekstraktów antocyjanowych miareczkowanych jonami Fe^{2+} . Końcowe stężenie ekstraktów wynosiło 0,03 g/ml natomiast końcowe stężenie żelaza wynosiło 0,33 mM. 0* - nie zaobserwowano procesu powstawania pasma pochodzącego od kompleksów ↑ lub ↓ - oznaczają wzrost lub spadek absorbancji (ΔA) maksimum pików pochodzących od flawonoidów (↓) i od kompleksów (↑)

Dane zamieszczone w tabeli 8 świadczą o braku zdolności chelatowania jonów żelaza przez ekstrakty z derenia oraz mahonii. Dodatkowo brak punktu izozbestycznego (świadczącego o równowadze w roztworze pomiędzy formą wolną oraz skompleksowaną [Cornard i wsp. 2001]) potwierdził brak zjawiska kompleksowania. Zmniejszanie się absorbancji pików pochodzących od antocyjanów ($\lambda = 509$ nm) podczas miareczkowania jonami żelaza spowodowane było rozcieńczaniem próby.

5.1.8 Wyznaczanie współczynników podziału ekstraktów roślinnych pomiędzy oktanol i wodę (P)

Współczynniki podziału ekstraktów roślinnych pomiędzy oktanol i wodę wyrażono jako $\log P$. Wartości P wyznaczano na podstawie wzoru opisanego w rozdziale 4.4.10. Zlogarytmowane wartości P ($\log P$) zamieszczono na rysunku 54 oraz w załączniku 12.

Wartości ujemne $\log P$ świadczą o większym stężeniu związku w wodzie w porównaniu z oktanolem. Najniższą wartość $\log P$ wykazał ekstrakt z derenia ($-0,38 \pm 0,02$), natomiast większe wartości, nieznacznie różniące się między sobą otrzymano dla berberysu oraz mahonii (odpowiednio $-0,25 \pm 0,02$ oraz $-0,27 \pm 0,02$). Powinowactwo badanych ekstraktów do fazy wodnej świadczy o ich hydrofilowym charakterze, co skutkuje małym ich powinowactwem do fazy lipofilnej reprezentowanej w tym doświadczeniu przez oktanol.

Najwyższe wartości $\log P$ otrzymano dla ekstraktu z ogórecznika oraz zielonej herbaty (odpowiednio $0,52 \pm 0,03$ oraz $0,54 \pm 0,03$). W przypadku arniki otrzymano wartość mniejszą od powyższych $0,30 \pm 0,06$, co również świadczy o powinowactwie do fazy organicznej. Analizę statystyczną zamieszczono w załączniku 13.

5.1.9 Wyznaczanie stałych dysocjacji ekstraktów roślinnych w układzie liposomy EYPC:bufor

Stałe dysocjacji badanych związków w układzie liposomy:bufor wyznaczano na podstawie badania gaszenia fluorescencji sondy 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrienu (DPH) wbudowanej w błonę liposomów EYPC. W wyniku modyfikacji błony ekstraktami polifenolowymi rejestrowano zanik fluorescencji sondy.

Sporządzono wykresy Sterna-Volmera:

$$\frac{1}{\frac{F_0}{F} - 1} = f\left(\frac{1}{[Sub]}\right)$$

gdzie: F_0 i F - intensywność fluorescencji próby odpowiednio bez i z przeciwutleniaczem, $[Sub]$ - stężenie badanego ekstraktu polifenolowego w mg/ml. Z prostoliniowego charakteru wykresu Sterna-Volmera (załącznik 11) wyznaczano wartość nachylenia prostej i obliczano wartość parametru stałej dysocjacji – K_d (wzór

rozdział 4.4.11). Wartości stałych dysocjacji przedstawiono na wykresie 55 oraz zebrano w załączniku 12.

Podobnie jak w przypadku wyznaczania współczynnika podziału pomiędzy oktanol i wodę, badane ekstrakty wykazały znaczące zróżnicowane powinowactwo do błony liposomów EYPC. Wysoka wartość K_d świadczy o małym powinowactwie ekstraktu do błony liposomów uformowanych z fosfatydylocholiny jajecznej. Największe wartości K_d , czyli małe powinowactwo do błony liposomów, wykazały ekstrakty z berberysu, derenia oraz mahonii. Wartości stałych dysocjacji dla tych trzech ekstraktów polifenolowych różniły się znacząco statystycznie. Wartości K_d wynosiły od $1,16 \pm 0,07$ mg/ml dla berberysu do $2,55 \pm 0,08$ mg/ml dla derenia. Najniższą wartość stałej K_d ($4,66 \cdot 10^{-3} \pm 1,10 \cdot 10^{-4}$ mg/ml), czyli najbardziej hydrofobowy charakter, posiadał ekstrakt z zielonej herbaty. Dla ogórecznika oraz arniki wartości stałej K_d były znacząco różne i wynosiły odpowiednio $1,27 \cdot 10^{-2} \pm 8,90 \cdot 10^{-4}$ mg/ml oraz $6,26 \cdot 10^{-3} \pm 1,61 \cdot 10^{-4}$ mg/ml. Charakter hydrofobowy ekstraktów polifenolowych malał zgodnie z relacją: zielona herbata > arnika > ogórecznik > berberys > mahonia > dereń.

5.2 Flawonoidy

Analogiczne aktywność przeciwutleniającą oraz właściwości przeciwrodnikowe określano dla flawonoidów, będących głównymi składnikami wcześniej opisanych ekstraktów roślinnych. W badaniach zastosowano następujące flawonoidy:

- cyjanidyna oraz jej pochodną cukrową cyjanidyno-3-galaktozyd dla ekstraktów z berberysu, derenia oraz mahonii,
- kwercetyna oraz jej pochodną cukrową kwercetyno-3-galaktozyd dla ekstraktu z ogórecznika,
- kwas chlorogenowy dla arniki,
- epikatechina oraz galusan epigalokatechiny (EGCG) dla zielonej herbaty.

5.2.1 Pomiar inhibicji utleniania liposomów EYPC w obecności flawonoidów - TBARS

Wyniki badań aktywności przeciwutleniającej flawonoidów zamieszczono na rysunku 56a oraz 56b. Właściwości przeciwutleniające wyrażono jako parametr IC_{50} [mM], który został opisany w punkcie 5.1.1.

Z analizy danych zawartych na rysunku 56a widać, że cyjanidyna okazała się dobrym przeciwutleniaczem gdy peroksydację błon liposomów EYPC indukowano jonami

Fe^{2+} /askorbinian ($\text{IC}_{50} = 1,48 \pm 0,06 \mu\text{M}$). Znacząco wyższą wartość parametru IC_{50} dla cyjanidyny zaobserwowano w przypadku utleniania związkiem AAPH ($\text{IC}_{50} = 0,12 \pm 0,30 \mu\text{M}$), a najwyższą gdy liposomy EYPC naświetlano promieniowaniem UVC ($\text{IC}_{50} = 56,03 \pm 2,40 \mu\text{M}$). Cyjanidyno-3-galaktozyd, podobnie jak cyjanidyna, okazał się najsłabszym przeciwutleniaczem gdy peroksydację błon liposomów indukowano promieniowaniem UVC ($\text{IC}_{50} = 1300,02 \pm 33,32 \mu\text{M}$). W przypadku utleniania błon związkiem AAPH oraz jonami Fe^{2+} /askorbinian wartości parametru IC_{50} dla cyjanidyno-3-galaktozydu wynosiły odpowiednio: $18,21 \pm 0,58 \mu\text{M}$ oraz $24,04 \pm 1,00 \mu\text{M}$. Najsilniejszym przeciwutleniaczem okazała się kwercetyna. Wartości parametru IC_{50} dla kwercetyny wynosiły: $\text{IC}_{50} = 1,01 \pm 0,07 \mu\text{M}$ (AAPH), $\text{IC}_{50} = 3,15 \pm 0,18 \mu\text{M}$ (Fe^{2+} /askorbinian), $\text{IC}_{50} = 1,80 \pm 0,06 \mu\text{M}$ (UVC). Pochodna cukrowa kwercetyny, kwercetyno-3-galaktozyd, wykazała niższą aktywność przeciwutleniającą w sytuacji gdy peroksydację lipidów indukowano związkiem AAPH oraz promieniowaniem UVC. W tych przypadkach uzyskano czterokrotnie wyższą wartość parametru IC_{50} (odpowiednio: $4,43 \pm 0,29 \mu\text{M}$ oraz $4,43 \pm 0,31 \mu\text{M}$). Wyższe właściwości ochronne kwercetyno-3-galaktozyd wykazał wobec procesów utleniania błon indukowanych jonami Fe^{2+} /askorbinian ($\text{IC}_{50} = 11,84 \pm 0,50 \mu\text{M}$). W przypadku kwasu chlorogenowego wartości parametru IC_{50} malały, zgodnie z następującą relacją: $\text{IC}_{50} = 236,04 \pm 9,69 \mu\text{M}$ (UVC) < $\text{IC}_{50} = 77,61 \pm 1,50 \mu\text{M}$ (Fe^{2+} /askorbinian), $\text{IC}_{50} = 8,29 \pm 0,43 \mu\text{M}$ (AAPH). Związek EGCG najsilniej ochraniał lipidy poddane peroksydacji związkiem AAPH ($\text{IC}_{50} = 2,90 \pm 0,07 \mu\text{M}$). Gdy induktorem peroksydacji błon liposomów EYPC były jony Fe^{2+} /askorbinian wartość parametru IC_{50} dla EGCG była około 4-krotnie niższa i wynosiła $8,76 \pm 0,17 \mu\text{M}$. Wobec utleniania liposomów promieniowaniem UVC związek EGCG wykazał najniższą aktywność przeciwutleniającą ($\text{IC}_{50} = 38,62 \pm 1,65 \mu\text{M}$). Wartość parametru IC_{50} dla epikatechiny malała zgodnie z relacją: $\text{IC}_{50} = 251,41 \pm 16,51 \mu\text{M}$ (UVC) > $\text{IC}_{50} = 5,02 \pm 0,04 \mu\text{M}$ (AAPH) > $\text{IC}_{50} = 1,97 \pm 0,15 \mu\text{M}$ (Fe^{2+} /askorbinian).

Po uwzględnieniu analizy statystycznej rezultatów badań stwierdzono, że badane flawonoidy posiadały najniższe wartości parametru IC_{50} , czyli posiadały najwyższe właściwości ochronne, w przypadku utleniania indukowanego związkiem AAPH. Badane flawonoidy posiadały najwyższe wartości parametru IC_{50} gdy utleniania związane było z promieniowaniem UVC.

Dane na rysunku 56b przedstawiono dodatkowo dla zilustrowania różnic w aktywności przeciwutleniającej badanych flawonoidów zależnej od sposobu utleniania liposomów.

Podsumowując je można napisać następujące sekwencje aktywności przeciwutleniającej:

- AAPH > jony Fe^{2+} /askorbinian > promieniowanie UVC,
- podczas utleniania związkiem AAPH: kwercetyna > EGCG > kwercetyno-3-galaktozyd > epikatechina > kwas chlorogenowy > cyjanidyna > cyjanidyno-3-galaktozyd,
- podczas utleniania jonami Fe^{2+} /askorbinian: cyjanidyna > epikatechina > kwercetyna > EGCG > kwercetyno-3-galaktozyd > cyjanidyno-3-galaktozyd > kwas chlorogenowy,
- podczas utleniania promieniowaniem UVC: kwercetyna > kwercetyno-3-galaktozyd > EGCG > cyjanidyna > kwas chlorogenowy > epikatechina > cyjanidyno-3-galaktozyd.

Aktywność przeciwutleniającą badanych flawonoidów porównano z aktywnością antyoksydacyjną Troloksu, traktowanego jako przeciwutleniacz standardowy i wyrażono jako parametr TEAC. Wartość tego parametru większa od jedności świadczy o wyższych właściwościach przeciwutleniających badanej substancji w porównaniu z Troloksem.

Z rysunku 57a wynika, że wszystkie badane flawonoidy wykazują wyższą aktywność przeciwutleniającą w porównaniu z Troloksem, gdy peroksydację błon liposomów EYPC indukowano związkiem AAPH. W przypadku gdy utleniania lipidów indukowano jonami Fe^{2+} /askorbinian otrzymano parametr TEAC mniejszy od jedności dla: cyjanidyno-3-galaktozydu ($0,44 \pm 0,02$), kwercetyno-3-galaktozydu ($0,91 \pm 0,04$) oraz kwasu chlorogenowego ($0,14 \pm 0,32 \cdot 10^{-2}$). Podczas naświetlania błon liposomów promieniowaniem UVC większość flawonoidów okazała się słabszym, w porównaniu z Troloksem przeciwutleniaczem. TEAC w przypadku naświetlania liposomów promieniowaniem UVC był mniejszy od jedności dla cyjanidyny ($0,21 \pm 0,01$), cyjanidyno-3-galaktozydu ($0,01 \pm 0,21 \cdot 10^{-3}$), kwasu chlorogenowego ($0,05 \pm 0,22 \cdot 10^{-2}$), EGCG ($0,31 \pm 0,01$) oraz epikatechiny ($0,05 \pm 0,32 \cdot 10^{-2}$).

Z danych zamieszczonych na rysunku 57b zauważono, że najslabszymi w porównaniu z Troloksem przeciwutleniaczami okazały się cyjanidyno-3-galaktozyd oraz kwas chlorogenowy. Kwercetyna w każdym przypadku inicjowania peroksydacji lipidów wykazała aktywność przeciwutleniającą wyższą w porównaniu z Troloksem. Wartości TEAC dla kwercetyny wynosiły: $33,77 \pm 2,44$ (AAPH), $3,40 \pm 0,19$ (Fe^{2+} /askorbinian) oraz $6,68 \pm 0,22$ (UVC).

Analizę statystyczną opisanych wyników zamieszczono w załączniku 14a.

5.2.2 Gaszenie wolnych rodników DPPH[•] przez flawonoidy

Wyniki badania aktywności przeciwrodnikowej flawonoidów, wobec rodników DPPH[•], przedstawiono na rysunku 58, w postaci wartości parametru TEAA (ang. Trolox Equivalent Antiradical Activity). Wartość TEAA większa od jednoświadczy o wyższej aktywności flawonoidów do wychwytywania wolnych rodników DPPH[•] w porównaniu z aktywnością przeciwrodnikową Troloksu. Analizując dane przedstawione na rysunku 58 zauważono, że wszystkie flawonoidy wychwytywały wolne rodniki DPPH[•] skuteczniej aniżeli Troloks. Najwyższą aktywność przeciwrodnikową posiadał związek EGCG (TEAA = $4,74 \pm 0,11$). Epikatechina, kwercetyna oraz kwercetyno-3-galaktozyd wykazały mniejszą aktywność, jednak wciąż silniejszą w porównaniu z Troloksem (próby należały do grupy jednorodnej). Słabszą aktywność wykazały cyjanidyna oraz cyjanidyno-3-galaktozyd (TEAC = ok. 2, próby należały do grupy jednorodnej). Najniższą aktywność wykazał kwas chlorogenowy (TEAC = $1,92 \pm 0,02$). Analizę statystyczną opisanych powyżej wyników zamieszczono w załączniku 15.

5.2.3 Oznaczanie zdolności flawonoidów do redukovania jonów żelaza – FRAP

W celu oznaczenia zdolności flawonoidów do redukovania jonów Fe³⁺ do Fe²⁺ wykorzystano metodę FRAP. Otrzymane wyniki redukovania jonów żelaza porównano z aktywnością redukcji Troloksu. Większa od jednoświadczy o wyższej zdolności do redukovania jonów żelaza niż Troloksu.

Analizując dane zebrane na rysunku 59 zauważono, że wszystkie badane flawonoidy wykazały wartość parametru FRAP większą od jednoświ. Wśród badanych flawonoidów wartość parametru FRAP malała według relacji: cyjanidyna ($6,88 \pm 0,36$) > kwercetyna ($5,10 \pm 0,28$) > EGCG ($4,30 \pm 0,20$) > cyjanidyno-3-galaktozyd ($3,52 \pm 0,21$) > epikatechina ($3,35 \pm 0,17$) > kwas chlorogenowy ($2,40 \pm 0,12$) > kwercetyno-3-galaktozyd ($1,63 \pm 0,03$). Dokonując analizy statystycznej omówionych powyżej wyników zauważono, że badane flawonoidy stanowiły odrębne grupy statyczne z wyjątkiem cyjanidyno-3-galaktozydu oraz epikatechiny, które należały do grupy jednorodnej. Szczegółowe dane zamieszczono w załączniku 15.

5.2.4 Chelatowanie jonów żelaza przez flawonoidy

Widma absorpcyjne metanolowych roztworów cyjanidyny oraz cyjanidyno-3-galaktozydu miareczkowanych jonami Fe^{2+} zamieszczono na rysunku 60.

Charakteryzują się one widocznym maksimum, charakterystycznym dla antocyjanów przy długości fali wynoszącej ok. 530 nm oraz pasmem pochodzącym od kompleksu antocyjanu z jonami żelaza. Analogicznie jak w rozdziale 5.1.7, w którym określano zdolność ekstraktów polifenolowych do kompleksowania jonów Fe^{2+} , przyjętymi parametrami do opisu tego zjawiska były wartości przyrostu absorbancji pików pochodzącego od kompleksu ($\Delta A_{\text{kompleks}}$) oraz zmniejszenia absorbancji pików pochodzącego od badanych flawonoidów ($\Delta A_{\text{flawonoid}}$), a także przesunięcie batochromowe, czyli przesunięcie pików, pochodzącego od flawonoidu ($\Delta \lambda$) w kierunku fal dłuższych.

Wartości tych parametrów zamieszczono w tabeli 9.

FLAWONOIDY	PRZESUNIĘCIA HIPERCHROMOWE (ΔA) ORAZ BATOCHROMOWE ($\Delta \lambda$) MAKSIMUM PIKU		
	$\Delta A_{\text{flawonoid}}$	$\Delta A_{\text{kompleks}}$	$\Delta \lambda$ [nm]
cyjanidyna/ Fe^{2+}	1,46↓	0,211↑	0*
cyjanidyno-3-galaktozyd/ Fe^{2+}	1,21↓	0,04↑	8

Tab. 9. Wartości przesunięć hiperchromowych (ΔA) oraz batochromowych ($\Delta \lambda$) [nm] maksimum pików absorbancji cyjanidyny i cyjanidyno-3-galaktozydu miareczkowanych jonami żelaza. Końcowe stężenie cyjanidyny i cyjanidyno-3-galaktozydu wynosiło 0,1 mM natomiast końcowe stężenie żelaza wynosiło 0,33 mM. 0* nie zaobserwowano procesu powstawania pasma pochodzącego od kompleksów ↑ lub ↓ - oznaczają wzrost lub spadek absorbancji (ΔA) maksimum pików pochodzących od flawonoidów (↓) i od kompleksów (↑)

Absorbancja pików pochodzących od antocyjanów zarówno cyjanidyny, jak i cyjanidyno-3-galaktozydu, przy długości fali również 539 nm zmniejszała się podczas miareczkowania jonami Fe^{2+} . Dla cyjanidyny nastąpiło obniżenie absorbancji o 1,46; natomiast dla cyjanidyno-3-galaktozydu o 1,21. Należy zaznaczyć, że tylko przypadku cyjanidyno-3-galaktozydu w miarę miareczkowania jonami Fe^{2+} zaobserwowano efekt batochromowy o 8 nm. Podczas miareczkowania cyjanidyny pojawił się nowy pik pochodzący od tworzącego się kompleksu, którego absorbancja wzrastała, wraz ze wzrostem stężenia jonów żelaza. Dla maksymalnego stężenia jonów Fe^{2+} (0,33 mM)

absorbancja pików pochodzącego od kompleksu antocyjan- Fe^{2+} wzrosła o 0,211. Obserwacja ta świadczyła o wzroście stężenia powstającego kompleksu przy jednoczesnym spadku ilości wolnych cząsteczek cyjanidyny. Dodatkowo podczas miareczkowania cyjanidyny żelazem, zaobserwowano punkt izozbestyczny przy długości fali równej 580 nm.

5.2.5 Wyznaczanie współczynników podziału flawonoidów pomiędzy oktanol i wodę (P)

Współczynniki podziału flawonoidów pomiędzy oktanol i wodę wyrażano jako $\log P$. Wartość P wyznaczano na podstawie wzoru opisanego w rozdziale 4.4.10. Po zlogarytmowaniu wartości P otrzymano $\log P$, które zamieszczono na rysunku 61 oraz w załączniku 17. Dodatnia wartość tego parametru świadczyła o powinowactwie badanego związku do fazy organicznej reprezentowanej przez oktanol.

Wartość $\log P$, czyli powinowactwo do oktanolu zmieniała się według relacji: cyjanidyno-3-galaktozyd ($-1,53 \pm 0,07$) < cyjanidyna ($-1,42 \pm 0,04$) < kwas chlorogenowy ($-0,99 \pm 0,03$) < epikatechina ($0,40 \pm 0,02$) < EGCG ($0,98 \pm 0,04$) < kwercetyno-3-galaktozyd ($1,09 \pm 0,04$) < kwercetyna ($1,43 \pm 0,07$). Analizując dane z rysunku 61 zauważono, że flawonoidami, które wykazały powinowactwo do fazy wodnej były związki o ujemnej wartości $\log P$: kwas chlorogenowy, cyjanidyna oraz cyjanidyno-3-galaktozyd. Warto zwrócić uwagę na fakt, że podstawnik cukrowy zwiększał charakter hydrofilowy cząsteczki, co zauważono na przykładzie cyjanidyny i cyjanidyno-3-galaktozydu oraz kwercetyny i kwercetyno-3-galaktozydu.

5.2.6 Wyznaczanie stałych dysocjacji flawonoidów w układzie liposomy EYPC : bufor

Stałe dysocjacji (K_d) badanych flawonoidów w układzie liposomy:bufor wyznaczano na podstawie gaszenia fluorescencji sondy 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrienu (DPH) wbudowanej w liposomy EYPC. W wyniku modyfikacji błony flawonoidami rejestrowano zanik fluorescencji sondy.

Na podstawie prostoliniowego charakteru wykresu Sterna-Volmera, to jest zależności:

$$\frac{1}{\frac{F_0}{F} - 1} = f\left(\frac{1}{[Sub]}\right),$$

gdzie: F_0 i F - intensywność fluorescencji próby odpowiednio bez i z przeciwutleniaczem, $[Sub]$ - stężenie badanego flawonoidu ekstraktu polifenolowego w mol/l, wyznaczano wartość nachylenia prostej, a następnie obliczano wartość parametru stałej dysocjacji – K_d (rozdział 4.4.11) Wykresy Sterna-Volmera dla flawonoidów zebrano w załączniku 16. Wartości stałej dysocjacji przedstawiono na rysunku 62 oraz zebrano w załączniku 17.

Wartość K_d malała, czyli powinowactwo do błony liposomów wzrastało, według relacji: kwas chlorogenowy ($6,43 \pm 0,44 \mu\text{M}$) > cyjanidyno-3-galaktozyd ($5,18 \pm 0,18 \mu\text{M}$) > cyjanidyna ($4,24 \pm 0,19 \mu\text{M}$) > kwercetyno-3-galaktozyd ($3,16 \pm 0,13 \mu\text{M}$) > epikatechina ($2,31 \pm 0,18 \mu\text{M}$) > EGCG ($0,62 \pm 0,02 \mu\text{M}$) > kwercetyna ($0,11 \pm 6,93 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$). Badane flawonoidy wykazały istotne różnice statystyczne w powinowactwie do błony (analiza statystyczna w załączniku 17).

5.3 Badania właściwości fizycznych liposomów

5.3.1 Badania wpływu karboksyfluoresceiny (CF)

Przeprowadzono badania wpływu karboksyfluoresceiny z liposomów w zależności od długości łańcucha oraz liczby wiązań podwójnych w łańcuchu acylowym lipidów. Procentowy wpływ karboksyfluoresceiny obliczano ze wzoru opisanego w punkcie 4.4.12.

Z analizy danych zamieszczonych na rysunku 63a oraz w załączniku 18 wynika, że procentowy wpływ CF malał wraz ze wzrostem liczby atomów węgla w łańcuchu

acylowym cząsteczki lipidu. Najmniejszy procentowy wpływ, czyli największą szczelność wykazały błony liposomów utworzonych z lipidów posiadających 22 atomy węgla w łańcuchu ($0,13 \pm 0,01$ %). Trzy razy większy procentowy wpływ CF, w porównaniu z liposomami uformowanymi z lipidu 22:0, zaobserwowano w przypadku pęcherzyków lipidowych utworzonych z distearoilofosfatydylocholiny (DSPC) ($0,33 \pm 0,01$ %) mającej w łańcuchu acylowym 18 atomów węgla (18:0). W przypadku dipalmitoilofosfatydylocholiny (DPPC) zawierającej 16 atomów węgla (16:0) wpływ CF osiągnął wartość $0,68 \pm 0,03$ %. Dla fosfatydylocholiny jajecznej (EYPC) oraz uwodornionej fosfatydylocholiny sojowej (HSPC), czyli lipidów zawierających w swojej cząsteczce różne długości łańcuchów, otrzymano największy procentowy wpływ CF - ok. 3%. Długość łańcucha w stopniu istotnym wpływała na szczelność uformowanych liposomów.

Kolejnym etapem badania procentowego wpływ CF było określanie wpływu zawartość liczby wiązań podwójnych w łańcuchu acylowym cząsteczki lipidu na szczelność błon pęcherzyków lipidowych z nich utworzonych. Analizując wyniki przedstawione na rysunku 63b, oraz w załączniku 19 zaobserwowano, że stopień uwodornienia lipidów w stopniu istotnym wpłynął na wpływ karboksyfluoresceiny zamkniętej wewnątrz liposomów. Najbardziej szczelne, o najmniejszym procentowym wpływ CF, były błony liposomów utworzone z distearoilofosfatydylocholiny (DSPC), zawierającej w łańcuchu acylowym 18 atomów węgla i nie posiadających wiązań podwójnych w łańcuchu (18:0). Procentowy wpływ CF z pęcherzyków lipidowych z DSPC wyniósł $0,33 \pm 4,51 \cdot 10^{-3}$ %. Dwa razy większy procentowy wpływ CF zaobserwowano wówczas gdy liposomy uformowano z lipidu zawierającego taką samą liczbę atomów węgla oraz jedno wiązanie nienasycone w łańcuchu acylowym – dioleoilofosfatydylocholina (18:1). Zwiększenie liczby wiązań podwójnych o kolejne w łańcuchu powodowało wzrost wpływ CF do wartości $4,09 \pm 0,14$ % dla lipidu o 18 atomach węgla i dwóch wiązaniach podwójnych (18:2). Badania procentowego wpływ CF przeprowadzono także dla lipidu zawierającego 18 atomów węgla i trzy wiązania nasycone w łańcuchu acylowym (18:3) – dilynolenoilofosfatydylocholiny (DLinPC). Zamknięta karboksyfluoresceina w pęcherzykach lipidowych z 18:3 wpływała z nich tuż po nałożeniu na kolumnę z żelom do sączenia molekularnego. Niemożliwe było zebranie frakcji liposomów zawierających zamknięty barwnik. Świadczyła o tym seledynowa barwa sączonej się mieszaniny. Procentowy wpływ CF z liposomów uformowanych z lipidu zawierającego w swojej cząsteczce o dwa atomy węgla więcej

oraz cztery wiązania podwójne (20:4) - diarachidonoilofosfatydylocholina (DArchPC) osiągnął największą wartość wynoszącą $11,83 \pm 0,09$ %.

5.3.2 Pomiar efektywności zamykania karboksyfluoresceiny (CF)

Wyniki pomiaru efektywności zamykania karboksyfluoresceiny w zależności od długości łańcucha acylowego lipidów budujących liposomy zebrano na rysunku 64a oraz w załączniku 18. Procentową efektywność zamykania karboksyfluoresceiny wyliczono na podstawie wzoru opisanego w punkcie 4.4.13.

Analizując dane zauważono, że długość łańcucha acylowego, czyli liczba atomów węgla w łańcuchu acylowym w cząsteczce lipidów, w sposób istotny wpływała na efektywność zamykania CF wewnątrz liposomów uformowanych z tych lipidów.

Najwyższą efektywność zamykania ($0,17 \pm 4,93 \cdot 10^{-3}$ %) otrzymano dla liposomów uformowanych z fosfatydylocholiny jajecznej (EYPC). Dla uwodornionej fosfatydylocholiny sojowej otrzymano najniższą efektywność zamykania CF - $0,07 \pm 2,08 \cdot 10^{-3}$ %. W przypadku lipidów różniących się długością łańcucha acylowego zaobserwowano obniżanie efektywności zamykania CF w następującym porządku: 16:0 ($0,15 \pm 3,21 \cdot 10^{-3}$ %) > 18:0 ($0,11 \pm 3,51 \cdot 10^{-3}$ %) > 22:0 ($0,10 \pm 4,58 \cdot 10^{-3}$ %). Wzrost liczby atomów węgla w łańcuchach acylowych w cząsteczce lipidu skutkował mniejszą efektywnością zamykania CF.

Wyniki analogicznego doświadczenia, mającego na celu określanie wpływu liczby wiązań podwójnych w łańcuchu acylowym w cząsteczce lipidu, zebrano na rysunku 64b oraz w załączniku 19. Analizując dane zauważono, że im większa liczba wiązań nienasyconych w łańcuchu węglowodorowym lipidu tym większa efektywność zamykania. Procentowa efektywność zamykania CF wzrastała według relacji: 18:0 ($0,11 \pm 5,13 \cdot 10^{-3}$ %) < 18:1 ($0,12 \pm 3,61 \cdot 10^{-3}$ %) < 18:2 ($0,13 \pm 2,52 \cdot 10^{-3}$ %) < 20:4 ($0,16 \pm 7,64 \cdot 10^{-3}$ %).

Podsumowując, na efektywność zamykania CF miały wpływ zarówno liczba atomów węgla, jak i liczba wiązań podwójnych w łańcuchu acylowym cząsteczki lipidu. Parametry te wpływają na ułożenie przestrzenne łańcuchów acylowych w błonie liposomy, a co się z tym wiąże na zdolność zamykania w nich substancji.

5.3.3 Badania rozmiarów liposomów

Analizę rozkładu wielkości liposomów przeprowadzono przy użyciu aparatu Zetasizer Nano-ZS firmy Malvern, w którym wykorzystano zjawisko dynamicznego

rozproszenia światła (ang. dynamic light scattering - DLS). Zbadano rozmiary pęcherzyków lipidowych różniących się składem lipidowym oraz metodą ich otrzymywania. Do uformowania liposomów wykorzystano lipidy różniące się liczbą atomów węgla oraz liczbą wiązań podwójnych w łańcuchu acylowym. Zastosowane lipidy posiadały od 12 do 22 atomów węgla oraz od 1 do 4 wiązań podwójnych w łańcuchu acylowym. Nazwy chemiczne lipidów zebrano w tabeli 2. Do otrzymania pęcherzyków lipidowych zastosowano następujące metody: sonifikowania, kalibrowania przez filtry poliwęglanowe oraz cyklicznego zamrażania i rozmrażania (ang. freeze-thaw - FAT). Przeprowadzono także analizę rozmiarów liposomów otrzymanych metodą FAT zawierających zamknięty wewnątrz aktywny przeciwutleniająco związek. Na rysunku 65 zebrano przykładowe histogramy rozkładów średnic liposomów otrzymanych metodą kalibracji przez filtry poliwęglanowe.

W wyniku analizy przy użyciu Zetasizera otrzymano głównie trzy typy rozkładów średnic pęcherzyków lipidowych. Na rysunku 65a zamieszczono rozkład rozmiarów liposomów uformowanych z lipidu o 18 atomach węgla, z 3 wiązaniami podwójnymi w łańcuchu acylowym (18:3). Charakteryzował się on małą szerokością połówkową oraz posiadał jedno maksimum. Wyniki te świadczą o tym, że największa ilość liposomów posiadała jeden rozmiar średnicy, wskazując jednocześnie na wysoką jednorodność próby. Na rysunku 65b przedstawiono rozkład wielkości liposomów uformowanych z lipidu o takiej samej długości łańcucha acylowego, lecz posiadającego w nim jedno wiązanie podwójne (18:1). Cechą charakterystyczną tego rozkładu w porównaniu z rysunkiem 65a, jest dodatkowe maksimum, które świadczy o istnieniu drugiej populacji liposomów o innych rozmiarach. Szeroki rozkład liposomów różnych rozmiarów uformowanych z EYPC, widoczny na rysunku 65c wskazuje na niską homogenność próby, charakterystyczną dla liposomów uformowanych z fosfolipidów zawierających różne długości łańcuchów węglowodorowych. Dane liczbowe rozmiarów liposomów zamieszczono w załącznikach od 20 do 26.

Z analizy danych zamieszczonych w załączniku 20 oraz 21 dla liposomów otrzymanych w wyniku sonifikowania zauważono, że wzrost liczby atomów węgla w łańcuchu acylowym cząsteczki lipidu wpływał na wzrost średnicy uformowanych liposomów. Wartości te mieściły się w zakresie od około 32,7 nm dla dilauroilofosfatydylocholiny (12:0) do 78,8 nm dla distearoilofosfatydylocholiny (18:0). Pęcherzyki lipidowe o takich rozmiarach klasyfikuje się jako SUV (ang. small unilamellar vesicles).

Liposomy uformowane z lipidu o 22 atomach węgla w łańcuchu węglowodorowym posiadały rozmiary powyżej 1000 nm, a więc poza zakresem czułości pomiarowej aparatu. Pojawiający się drugi pik dla liposomów utworzonych z distearoilofosfatydylocholine (18:0) oraz drugi i trzeci dla pęcherzyków z dibehenoilofosfatydylocholine (22:0), świadczył o procesach agregacyjnych, jakie mogą mieć miejsce w temperaturze w której prowadzono pomiar (powyżej przejścia fazowego tych lipidów). Stosunkowo szeroki rozkład rozmiarów także w przypadku pęcherzyków z dilauroilofosfatydylocholine (12:0), dimirystoilofosfatydylocholine (14:0) oraz EYPC świadczył o małej homogenności tych prób. W przypadku liposomów przeciskanych bez względu na długość łańcucha acylowego lipidów, otrzymano rozmiary średnic liposomów w granicach od około 68,1 do 91,3 nm, czyli zbliżone do średnicy porów filtra przez które je kalibrowano. Rozkłady wielkości kalibrowanych pęcherzyków lipidowych charakteryzowały się wąskim oraz symetrycznym pikiem, czyli porównywalnym rozkładem średnic liposomów. Dla nasyconego lipidu o 18 atomach węgla (18:0) oraz lipidu o takiej samej długości łańcucha acylowego z jednym wiązaniem podwójnym (18:1) w łańcuchu zaobserwowano na histogramie drugi pik świadczący o procesach agregacji liposomów. Najmniejsze średnice (68,1 nm) wśród liposomów otrzymanych metodą kalibracji przez filtry poliwęglanowe wykazały liposomy uformowane z fosfatydylocholine jajecznej oraz z lipidu 18:3. W przypadku analizy rozmiarów liposomów sonifikowanych utworzonych z lipidów różniących się liczbą wiązań podwójnych w łańcuchu acylowym cząsteczki zaobserwowano, że pojawienie się jednego wiązania nienasyconego zmniejszyło rozmiary z 78,8 nm do 37,8 nm. Obecność większej liczby wiązań podwójnych w łańcuchu acylowym lipidu nie wpłynęła w tak znaczący sposób na zmianę rozmiarów liposomów otrzymanych w procedurze sonifikowania. W przypadku liposomów uformowanych z dilinoleilofosfatydylocholine (18:2), dilinolenilofosfatydylocholine (18:3) oraz diarachidonilofosfatydylocholine (20:4), otrzymanych metodą sonifikowania, rozmiary średnic wynosiły 32,7 nm. Rozkłady wielkości powyżej wymienionych pęcherzyków lipidowych charakteryzowały się szerokim rozkładem wielkości, czyli niską homogennością prób. Dla liposomów uformowanych z lipidów: 18:1 oraz 18:3 zaobserwowano pojawienie się trzech populacji liposomów o średnicach odpowiednio: 37,8; 122; 1110 nm oraz 32,7; 122; 1110 nm.

Analizując rozmiary liposomów otrzymanych metodą przeciskania przez filtry poliwęglanowe (załącznik 20 i 21) zauważono, że ani długość łańcucha acylowego ani liczba wiązań podwójnych w nim nie miała wpływu na rozmiar tworzonych z nich pęcherzyków lipidowych. Liposomy różniące się liczbą atomów węgla miały uśrednioną średnicę ok. 100 nm, lub mniejszą, bo takiej średnicy były pory filtrów przez które je kalibrowano. Populacja pęcherzyków lipidowych otrzymanych poprzez kalibrację była bardziej homogenna. W przypadku liposomów z EYPC zauważono szeroki rozkład uśrednionych wartości ich wielkości. Liposomy otrzymane metodą kalibracji zostały sklasyfikowane jako LUV (ang. large unilamellar vesicles).

W wyniku analizy danych zawartych w załącznikach od 22 do 26 zauważono, że rozmiary liposomów FAT wzrastały według następującej relacji: EYPC (11,7 nm) < 18:2 (15,7 nm) < DPPC (18,2 nm) < HSPC =18:1 (21,0 nm). Podczas obecności cholesterolu w błonie liposomów rozmiary ich wzrastały według następującej kolejności: EYPC (13,5 nm) < 18:2 (15,7 nm) < 18:1 (21,0 nm) < DPPC (24,4 nm) < HSPC (78,8 nm). Z analizy danych zawartych w załącznikach od 20 do 26 stwierdzono, że liposomy FAT poddane sonifikacji były mniejsze w porównaniu z pęcherzykami lipidowymi otrzymanymi w wyniku sonifikowania czy kalibrowania, bez względu na zastosowany do ich formowania lipid.

Badania rozkładu rozmiarów liposomów przeprowadzono również dla liposomów zawierających zamknięte w ich wnętrzu przeciwutleniacze. Histogramy dla wielowarstwowych liposomów otrzymanych metodą FAT-s z przeciwutleniaczami charakteryzowały się szerszym rozkładem wielkości w porównaniu z liposomami kalibrowanymi czy sonifikowanymi. Dotyczyło to zarówno liposomów z cholesterolem, jak i bez niego. Zamykanie przeciwutleniaczy w liposomach uformowanych z DPPC zwiększyło ich średnice. Zaobserwowano, że najsilniejszy efekt wzrostu średnic liposomów spowodowało zamykanie w nich kwercetyny. W tym przypadku nastąpił wzrost średnicy pęcherzyków lipidowych o 25,6 nm. W wyniku zamykania EGCG i arniki nastąpił wzrost średnicy pęcherzyków o 10 nm w przypadku epikatechiny o 14,7 nm. Ekstrakt z zielonej herbaty spowodował wzrost pęcherzyków lipidowych o 19,6 nm. Obecność cholesterolu w błonie liposomowych nośników z DPPC nie wpłynęła na ich rozmiary. Wyjątek stanowiły liposomy nie zawierające zamkniętych wewnątrz przeciwutleniaczy, gdzie obecność cholesterolu spowodowała niewielki wzrost średnicy o 6 nm.

Zamykanie przeciwutleniaczy wewnątrz liposomów uformowanych z EYPC w mniejszym stopniu wpłynęło na rozmiary pęcherzyków. W wyniku zamykania epikatechiny oraz zielonej herbaty rozmiary pęcherzyków lipidowych wzrosły o 6,5 nm, dla EGCG oraz arniki o 9,3 nm w stosunku do kontroli. Zamykanie kwercetyny wywołało największą zmianę w rozmiarach pęcherzyków lipidowych - o 21 nm. Dodatek cholesterolu do błony liposomów nie wpłynął znacznie na ich rozmiary.

Liposomy uformowane z HSPC charakteryzowały się większą homogennością w porównaniu z liposomami z EYPC czy z DPPC. Zamykanie ekstraktu z zielonej herbaty, kwercetyny, a w szczególności ekstraktu z arniki w liposomach z HSPC spowodowało wzrost średnic pęcherzyków lipidowych odpowiednio o: 11,7; 16,8; 22,8 nm. Obecność cholesterolu w błonie liposomów HSPC wpłynęła drastycznie na zwiększenie ich rozmiarów z 21,0 nm do 78,8 nm. W przypadku zamykania EGCG oraz epikatechiny w liposomach z HSPC z dodatkiem 40 mol % cholesterolu zauważono wyjątkowe zmniejszenie rozmiarów pęcherzyków lipidowych w wyniku zamykania przeciwutleniaczy – o 35 nm. W przypadku zamykania zielonej herbaty oraz arniki w liposomach HSPC z cholesterolem zaobserwowano wzrost średnicy pęcherzyków lipidowych odpowiednio o 10,7 nm oraz 27,2 nm. Zamykanie kwercetyny w tym wypadku nie wpłynęło na rozmiary liposomów. Dodatek cholesterolu w tym wypadku wpłynął na zwiększoną tendencję do tworzenia agregatów.

Dla liposomów utworzonych z lipidu 18:1 oraz 18:2 zamykanie w ich wnętrzu przeciwutleniaczy nie wpłynęło znacznie na rozmiary pęcherzyków. Maksymalną zmianę rozmiarów pęcherzyków zaobserwowano dla liposomów uformowanych z lipidu 18:1 oraz z lipidu 18:1 z cholesterolem zawierających w swoim wnętrzu kwercetynę – wzrost odpowiednio o 16,8 i 11,7 nm. Zamykanie EGCG, epikatechiny, zielonej herbaty w pęcherzykach lipidowych utworzonych z lipidu 18:1 oraz zielonej herbaty w liposomach utworzonych z lipidu 18:1 z cholesterolem spowodowało obniżenie średnicy pęcherzyków o 2,8 nm. W przypadku zamykania arniki w liposomach uformowanych z lipidu 18:1 i EGCG, epikatechiny oraz arniki w pęcherzykach uformowanych z lipidu 18:1 z cholesterolem nie zaobserwowano zmian rozmiarów średnic pęcherzyków lipidowych. Podobny wpływ miał dodatek 40 mol % cholesterolu zarówno dla liposomów utworzonych z lipidu 18:1, jak i z lipidu 18:2. Dla pęcherzyków uformowanych z lipidu 18:2 oraz z lipidu 18:2 z dodatkiem cholesterolu, w wyniku zamykania przeciwutleniaczy w ich wnętrzu zaobserwowano, niewielki wzrost rozmiarów pęcherzyków. W wyniku zamykania kwercetyny, zielonej

herbaty w liposomach z lipidu 18:1, a także zielonej herbaty w pęcherzykach z lipidu 18:1 z cholesterolem nastąpił wzrost średnic pęcherzyków o 2,5 nm. W pozostałych przypadkach zamykanie przeciwutleniaczy spowodowało wzrost średnic liposomów o 5,3 nm.

5.3.4 Badania anizotropii fluorescencji sondy DPH

Zbadano wpływ sposobu formowania pęcherzyków lipidowych oraz ich składu lipidowego na płynność błony liposomów. Zastosowano lipidy różniące się zarówno długością łańcucha acylowego, zawierającego w nim od 12 do 22 atomów węgla, jak i liczbą wiązań podwójnych (od 0 do 4) obecnych w łańcuchu. Nazwy chemiczne lipidów zestawiono w tabeli 2. Doświadczenie przeprowadzono metodą fluorymetryczną mierząc anizotropię fluorescencji sondy DPH. W błonie lipidowej sonda DPH lokuje się w rejonie hydrofobowym. Rezultaty badań przedstawiono na rysunku 66a oraz zestawiono w załączniku 27.

Najwyższą wartość anizotropii fluorescencji ($0,24 \pm 0,003$) otrzymano dla pęcherzyków lipidowych sonifikowanych utworzonych z lipidu zawierającego 22 atomy węgla w łańcuchu acylowym (22:0). Błony liposomów, zarówno otrzymanych metodą sonifikowania, jak i przeciskania przez filtry poliwęglanowe, wykazywały rosnącą wartość anizotropii fluorescencji DPH zgodnie z relacją: 12:0 < EYPC < 14:0 < HSPC < 16:0 < 18:0 < 22:0. Można zauważyć, że im więcej jest atomów węgla w łańcuchu acylowym cząsteczki lipidu tym wyższa była wartość anizotropii fluorescencji sondy DPH w błonie.

Analiza statystyczna danych zawartych w załączniku 27 dostarczyła informacji o istotnym wpływie metody otrzymywania liposomów na anizotropię fluorescencji sondy DPH. Błony liposomów sonifikowanych wykazywały wyższą, istotnie statystycznie ($p < 0,05$), anizotropię sondy DPH aniżeli błony liposomów przeciskanych. Największe różnice otrzymano dla lipidów o 16 (16:0 - DPPC) oraz 18 (18:0 - DSPC) atomach węgla w łańcuchu węglowodorowym. Wartość anizotropii dla liposomów DPPC oraz DSPC kalibrowanych stanowiła około 82% wartości anizotropii dla liposomów otrzymanych metodą sonifikowania. Nie udało się otrzymać liposomów z lipidu posiadającego 22 atomy węgla w łańcuchu acylowym (22:0) metodą przeciskania. Trudności te wynikały z wysokiej temperatury przejścia fazowego tego lipidu.

Wyniki doświadczeń badających wpływ liczby wiązań podwójnych w łańcuchu acylowym cząsteczki lipidu, z którego uformowano liposomy na anizotropię fluorescencji sondy DPH w błonach liposomów przedstawiono na rysunku 66b oraz zestawiono w załączniku 28. Najniższe wartości anizotropii fluorescencji sondy uzyskano dla błon liposomów uformowanych z lipidu zawierającego cztery wiązania podwójne (20:4) diarachidonoilofosfatydylocholiny (DArchPC) ($0,10 \pm 0,002$ dla liposomów sonifikowanych; $0,11 \pm 0,007$ dla liposomów kalibrowanych). Najwyższe wartości anizotropii fluorescencji wykazały liposomy uformowane z lipidu o 18 atomach węgla w łańcuchu i nie posiadających wiązania podwójnego (18:0) ($0,23 \pm 0,005$ dla liposomów sonifikowanych; $0,19 \pm 0,003$ dla liposomów kalibrowanych). Obecność jednego wiązania podwójnego w łańcuchu acylowym cząsteczki lipidu skutkowała zmniejszeniem anizotropii fluorescencji sondy DPH ($0,11 \pm 0,002$ dla liposomów sonifikowanych; $0,11 \pm 0,002$ dla liposomów kalibrowanych). Obecność dwóch i trzech wiązań podwójnych w łańcuchach węglowodorowych cząsteczki lipidu nie wpłynęła na zmianę anizotropii fluorescencji sondy DPH.

Błony liposomów sonifikowanych wykazały zazwyczaj wyższą wartość anizotropii fluorescencji sondy DPH, aniżeli błony liposomów otrzymanych metodą kalibracji przez filtry poliwęglanowe. Podobną zależność otrzymano także w badaniach wpływu długości łańcuchów acylowych na anizotropię fluorescencji sondy DPH. Anizotropia fluorescencji sondy DPH wzrastała wraz ze wzrostem długości łańcucha acylowego oraz wzrostem stopnia jego nasycenia lipidów tworzących błonę.

5.4 Tworzenie nośnika liposomowego

5.4.1 Wpływ ekstraktów roślinnych oraz flawonoidów na anizotropię fluorescencji sondy TMA-DPH

W badaniu wpływu ekstraktów polifenolowych oraz flawonoidów na płynność liposomów DPPC metodą fluorymetryczną zastosowano sondę fluorescencyjną TMA-DPH. W błonie lipidowej sonda TMA-DPH lokuje się poziomie czwartego atomu węgla w łańcuchach w cząsteczce lipidu (rys. 8). Wykresy względnych zmian anizotropii fluorescencji sondy TMA-DPH w zależności od stężenia badanych związków zamieszczono w załączniku 29 oraz na rysunkach 67 i 68.

Analizując wyniki z rysunku 67 można stwierdzić, że badane ekstrakty roślinne powodowały nieduży wzrost anizotropii fluorescencji sondy TMA-DPH. W największym stopniu błonę DPPC modyfikował ekstrakt z arniki powodując około 25 % wzrost anizotropii w stężeniu 0,08 mg/ml. W mniejszym stopniu, bo około 10 % wzrost tego parametru, spowodował ekstrakt z zielonej herbaty. Pozostałe ekstrakty: berberys, dereń, mahonia oraz ogórecznik w stężeniu 0,08 mg/ml w zasadzie nie powodowały zmian anizotropii sondy TMA-DPH. Zmiana mierzonego parametru w tych przypadkach wzrastała sukcesywnie nie przekraczając 5 %.

Zmiany względnej anizotropii sondy TMA-DPH w błonach liposomów DPPC pod wpływem badanych flawonoidów przedstawiono na rysunku 68, sugerując dwójaki wpływ tych związków.

Sukcesywny wzrost anizotropii tej sondy wraz ze wzrostem stężenia wykazywały: EGCG – około 16 % oraz epikatechina, cyjanidyna i cyjanidyno-3-galaktozyd do wartości nie przekraczającej 5 %. Warto zauważyć, że cyjanidyno-3-galaktozyd w mniejszym stopniu wpłynął na anizotropię sondy aniżeli jego forma aglikonowa – cyjanidyna. Różnice te były jednak bardzo małe i właściwie można je pominąć biorąc pod uwagę wartości odchyłeń standardowych podane w załączniku 29.

Do flawonoidów powodujących stężeniowo-zależne zmniejszenie względnej anizotropii sondy TMA-DPH: należą: kwas chlorogenowy (poniżej 5 %), kwercetyno-3-galaktozyd (8 %) oraz kwercetyna (około 15 %).

5.4.2 Badania efektywności zamykania przeciwutleniaczy w nośnikach liposomowych FAT-s

W celu stworzenia nośnika dla działającej przeciwutleniająco substancji zastosowano liposomy o różnym składzie lipidowym. Zamykano w liposomach te substancje, które we wcześniejszych badaniach wykazały duży potencjał przeciwutleniający: ekstrakty z arniki i zielonej herbaty oraz trzy flawonoidy: kwercetynę, EGCG oraz epikatechinę. Krzywe standardowe na podstawie których obliczano procent zamykania zamieszczono w załączniku 30. Na rysunku 69 przedstawiono wyniki procentowego zamykania przeciwutleniaczy w zależności od składu lipidowego liposomów.

Proces zamykania przeciwutleniaczy przebiegał najefektywniej w liposomach utworzonych z DPPC. Niższy procent zamykania uzyskano w liposomach z HSPC, a najmniej efektywnie w liposomach z fosfatydylocholiny jajecznej (EYPC). Dodatek

40 mol % cholesterolu do błon znacząco obniżył procent zamykania z wyjątkiem liposomów EYPC, w których obecność cholesterolu zwiększyła efektywność zamykania. Powodem dwójakiego rodzaju wpływu cholesterolu na zamykanie przeciwutleniaczy była różna temperatura przejścia fazowego lipidów zastosowanych do uformowania błon. Liposomy utworzone z DPPC najefektywniej zamykały EGCG ($76,31 \pm 2,20$ %), następnie epikatechinę ($55,55 \pm 1,47$ %) oraz kwercetynę ($53,78 \pm 1,18$ %). Niższą efektywność zamykania uzyskano dla liposomów DPPC z ekstraktami z zielonej herbaty ($33,29 \pm 0,64$ %) oraz arniki ($31,49 \pm 1,28$ %). W liposomach uformowanych z DPPC zawierających 40 mol % cholesterolu również najwyższą efektywność zamykania uzyskano dla EGCG ($46,17 \pm 2,17$ %), ekstraktu z zielonej herbaty ($29,75 \pm 1,35$ %) oraz epikatechiny ($24,67 \pm 1,43$ %). Procent zamykania kwercetyny w liposomach DPPC z cholesterolem zmalał do $13,51 \pm 1,01$ % i był zbliżony do wyniku uzyskanego dla arniki ($12,67 \pm 0,89$ %). W pęcherzykach lipidowych utworzonych z HSPC najwyższy procent zamykania uzyskano dla kwercetyny ($38,55 \pm 1,19$ %), podczas gdy dla EGCG i epikatechiny uzyskano zbliżone wartości (odpowiednio: $29,30 \pm 1,81$ %, $27,76 \pm 1,15$ %). W przypadku zamykania ekstraktów z arniki oraz zielonej herbaty uzyskano najniższe wartości stopnia zamykania odpowiednio: około $19,40 \pm 1,53$ % oraz $12,27 \pm 0,94$ %. Obecność cholesterolu w błonie liposomów z HSPC spowodowała, że efektywność zamykania zmalała o prawie połowę dla kwercetyny i arniki oraz dla epikatechiny i EGCG, osiągnęła odpowiednio ok. $10,56 \pm 0,69$ % oraz $7,86 \pm 0,49$ %. Wyjątek stanowił ekstrakt z zielonej herbaty dla którego procent zamykania w obecności cholesterolu nie uległ zmianie i wynosił około $11,70 \pm 0,63$ %.

Analizując wyniki zamieszczone na rysunku 69 stwierdzono, że procent zamykania wszystkich czterech substancji w liposomach formowanych z EYPC był wyraźnie najniższy. Nie przekraczał on wartości 10 % z wyjątkiem arniki ($11,82 \pm 0,91$ %).

Cholesterol obecny w błonie liposomów EYPC wpłynął na zwiększenie efektywności zamykania przeciwutleniaczy. Największy wpływ cholesterolu na ten proces zaobserwowano w przypadku kwercetyny ($45,94 \pm 1,86$ %), kolejno EGCG ($22,26 \pm 0,69$ %), epikatechiny ($23,45 \pm 1,26$ %) oraz arniki ($17,85 \pm 0,45$ %). Tylko w przypadku zamykania ekstraktu z zielonej herbaty w liposomach z EYPC:cholesterol (10:4) procent był niewielki i wyniósł $5,66 \pm 0,40$ %.

Analiza statystyczna danych zebranych w załączniku 30 pozwala na stwierdzenie, że rodzaj zamykanej substancji istotnie wpływał na procent zamykania

przeciwutleniaczy we wnętrzu liposomów (próby należały do różnorodnych grup). Stwierdzono, że efektywność zamykania ekstraktów roślinnych była niższa w porównaniu z efektywnością zamykania flawonoidów. Zastosowana w niniejszej pracy nowatorska metoda mikrokapsulacji (poddanie liposomów otrzymanych metodą FAT sonifikowaniu - FAT-s) umożliwiła uformowanie liposomowych nośników przeciwutleniaczy w liposomach DPPC o wysokiej efektywności zamykania EGCG, epikatechiny oraz kwercetyny (odpowiednio: $76,31 \pm 2,20$ %, $55,55 \pm 1,47$ %, $53,78 \pm 1,18$ %). Sugeruje się, że utworzone nośniki liposomowe, zarówno flawonoidów, jak również ekstraktów z arniki i zielonej herbaty w liposomach DPPC, dla których to ekstraktów otrzymano wysoką efektywność zamykania około 30 %, mogą zostać zastosowane w przemyśle spożywczym między innymi jako suplementy diety, jako funkcjonalne dodatki do żywności, jako dodatki zabezpieczające żywność przed procesami peroksydacji, a także w przemyśle kosmetycznym dermatologii jako składniki kremów i maści.

6 DYSKUSJA

Tematyka niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczy aktywności przeciwutleniającej ekstraktów polifenolowych oraz flawonoidów w odniesieniu do błon liposomów fosfolipidowych jako potencjalnych ich nośników.

Dla znalezienia preparatu o wysokiej aktywności przeciwutleniającej zbadano w tej pracy następujące ekstrakty polifenolowe z: berberysu, derenia, mahonii, ogórecznika, arniki oraz zielonej herbaty, a także flawonoidy - substancje odniesienia, obecne w wyżej wymienionych ekstraktach. Są to następujące flawonoidy: cyjanidyna, cyjanidyno-3-galaktozyd, kwercetyna, kwercetyno-3-galaktozyd, kwas chlorogenowy, epikatechina oraz galusan epigalokatechiny (EGCG). Dla określenia zakresu działania przeciwutleniającego badanych ekstraktów polifenolowych oraz flawonoidów oraz mechanizmu tego działania przeprowadzono badania ich aktywności przeciwutleniającej indukując peroksydację lipidów różnymi czynnikami, które były źródłem różnego rodzaju wolnych rodników. Badania nad ochroną przed wolnymi rodnikami błon liposomowych uformowanych z fosfatydylocholiny jajecznej i poddanych procesom peroksydacji przeprowadzono metodą TBARS. Utleniania błon indukowano trzema czynnikami: związkiem azowym AAPH, jonami Fe^{2+} /askorbinian oraz promieniowaniem UVC.

Dla wyrażenia aktywności przeciwutleniającej wykorzystano powszechnie stosowany parametr IC_{50} (ang. inhibition concentration). Wyraża on stężenie przeciwutleniacza w 50% hamujące proces peroksydacji. Niższa wartość stężenia IC_{50} oznacza wyższą aktywność przeciwutleniającą substancji [Areias i wsp. 2001]. Badane ekstrakty polifenolowe oraz flawonoidy wykazały bardzo zróżnicowaną aktywność w zależności od stosowanego czynnika, indukującego utleniania lipidów. Najwyższą aktywność przeciwutleniającą we wszystkich przypadkach indukowania peroksydacji liposomów EYPC otrzymano dla ekstraktów: z zielonej herbaty oraz arniki. Wartości IC_{50} dla zielonej herbaty wynosiły odpowiednio: $\text{IC}_{50} = 8,2 \cdot 10^{-3} \pm 2,2 \cdot 10^{-4}$ mg/ml (AAPH), $\text{IC}_{50} = 8,1 \cdot 10^{-3} \pm 2,0 \cdot 10^{-4}$ mg/ml (Fe^{2+} /askorbinian), $\text{IC}_{50} = 0,29 \pm 0,07$ mg/ml (UVC). Wartości te dla arniki były wyższe i wynosiły odpowiednio: $\text{IC}_{50} = 0,02 \pm 0,1 \cdot 10^{-2}$ mg/ml (AAPH), $\text{IC}_{50} = 0,07 \pm 0,4 \cdot 10^{-2}$ mg/ml (Fe^{2+} /askorbinian) oraz $\text{IC}_{50} = 0,09 \pm 0,6 \cdot 10^{-2}$ mg/ml (UVC). Najsłabszymi przeciwutleniaczami okazały się ekstrakty z derenia, mahonii oraz berberysu. Wartości ich parametrów IC_{50} znacznie przewyższały wartości otrzymane dla innych ekstraktów. Dla owoców berberysu

w przypadku utleniania błon związkami AAPH wartość IC_{50} wynosiła $0,14 \pm 0,01$ mg/ml. Podobne doświadczenie, dla określenia aktywności przeciwutleniającej metanolowego ekstraktu z berberysu, lecz dla ekstraktu otrzymanego z jego korzenia oraz kory wobec peroksydacji indukowanej związkami AAPH o stężeniu 10 mM przeprowadzili Kumar i Müller [1999]. Wyższe właściwości przeciwutleniające berberysu wykazane przez tych autorów ($IC_{50}^{\text{korzeń}} = 0,050$ mg/ml, $IC_{50}^{\text{kora}} = 0,040$ mg/ml) mogą sugerować odmienny skład zarówno jakościowy, jak i ilościowy tych ekstraktów otrzymanych w wyniku izolowania ich z innych aniżeli owoc części tej rośliny.

Wśród badanych w tej pracy flawonoidów najsilniejszymi przeciwutleniaczami okazały się te, które są głównymi komponentami najefektywniejszych ekstraktów polifenolowych. Należały do nich: kwercetyna oraz kwercetyno-3-galaktozyd, będące głównymi komponentami ekstraktu z arniki oraz EGCG, który obecny jest w zielonej herbacie. Najsłabszymi przeciwutleniaczami okazały się kwas chlorogenowy i cyjanidyno-3-galaktozyd oraz w przypadku utleniania promieniowaniem UVC - epikatechina. Podobną obserwację wyższej aktywności związku EGCG, w porównaniu z epikatechiną oraz kwasem chlorogenowym opisano w pracy Vinsona i Dabbagh [1998]. Autorzy ci przeprowadzili badania w innym układzie modelowym - lipoprotein niskiej gęstości (ang. low density lipoproteins - LDL). Porównując aktywność kwercetyny z kwercetyno-3-galaktozydem oraz cyjanidyny z cyjanidyno-3-galaktozydem zauważyli, że glikozydy zarówno kwercetyny, jak i cyjanidyny wykazały słabszą aktywność przeciwutleniającą. Wyższą aktywność przeciwutleniającą form aglikonowych od glikozydowych wykazali również Yang i wsp. [2001], Kong i wsp. [2003], Heo i wsp. [2007]. W innych badaniach brak wpływu ugrupowania cukrowego na aktywność przeciwutleniającą sugerowali Tsuda i wsp. [1996]. Wykazali oni natomiast zależność, że im większa jest liczba grup hydroksylowych w cząsteczce przeciwutleniacza tym silniejsze są jego właściwości antyoksydacyjne. Wpływ innych elementów budowy cząsteczek flawonoidów na ich aktywność przeciwutleniającą opisano w rozdziale 2.4.2 tej pracy. Najniższe wartości IC_{50} otrzymano dla kwercetyny w przypadku indukowania peroksydacji lipidów związkami AAPH ($1,01 \pm 0,07$ μ M) oraz promieniowaniem UVC ($1,80 \pm 0,06$ μ M). Wysoka aktywność przeciwutleniająca kwercetyny, a także kwercetyno-3-galaktozydu wynika z ich budowy cząsteczkowej (tabela 1) Jej istotą jest obecność grupy katecholowej w pierścieniu B cząsteczki. Kwercetyna posiada dodatkowo trzy grupy

OH w różnych pozycjach pierścienia A i C cząsteczki. Kwercetyna wykazuje płaską strukturę cząsteczkową, co zdaniem niektórych autorów sprzyja głębokiemu zakotwiczeniu jej w dwuwarstwie lipidowej błony. To z kolei może mieć pozytywne znaczenie w ochronie tych błon [Arora i wsp. 2000, Małolepsza i Urbanek 2000]. Niższa aktywność przeciwutleniająca, w porównaniu z kwercetyną oraz kwercetyno-3-galaktozydem, kwasem chlorogenowym, EGCG oraz epikatechiną najprawdopodobniej wynika z braku możliwości ich głębokiego zakotwiczenia w błonie ze względu na uwarunkowania geometryczne tych cząsteczek. EGCG oraz epikatechina nie zawierają w swojej budowie podwójnego wiązania pomiędzy atomami C₂ i C₃, nie posiadają też grupy karbonylowej w pozycji C₄. Niższą aktywność przeciwutleniającą EGCG oraz epikatechiny w porównaniu z kwercetyną wynika także z braku grupy karbonylowej, która zwiększa aktywność wychwytywania wolnych rodników, ponieważ zwiększa stabilność rodników fenoksylowych powstających z flawonoidów w wyniku reakcji z wolnymi rodnikami [Middleton i wsp. 2000]. Reakcję tą przedstawiono na rysunku 23. Grupa karbonylowa w połączeniu z podwójnym wiązaniem między C₂ oraz C₃, dodatkowo zwiększa zdolność flawonoidów do wychwytywania wolnych rodników poprzez delokalizację elektronów w pierścieniu B [Middleton i wsp. 2000]. Jednak stosunkowo wysoka aktywność przeciwutleniająca związku EGCG jest skutkiem obecności trzech grup hydroksylowych w pierścieniu B w jego cząsteczce oraz reszty kwasu galusowego, która dostarcza dodatkowych trzech grup hydroksylowych [Yao i wsp. 2004]. Cząsteczka epikatechiny zawiera natomiast w pierścieniu C tylko dwie grupy hydroksylowe w położeniu orto. Analizę aktywności przeciwutleniającej katechin, a w szczególności obecności w ich cząsteczkach reszty kwasu galusowego oraz reszty polifenolowej pierścienia B struktury wobec peroksydacji związkiem AAPH liposomów uformowanych z EYPC podjęli Laporta i wsp. [2007]. Wyniki ich doświadczeń wskazywały, że aktywność przeciwutleniająca katechin malała zgodnie z następującą relacją: galusan epikatechiny ($IC_{50} = 2,30 \mu M$) > galusan epigalokatechiny (EGCG) ($IC_{50} = 4,26 \mu M$) > epikatechina ($IC_{50} = 4,64 \mu M$) i była związana z powinowactwem tych związków do błony lipidowej [Laporta i wsp. 2007].

Wyniki aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów oraz flawonoidów porównano z aktywnością Troloksu i wyrażono parametrem TEAC (ang. Trolox Equivalment Antioxidant Capacity). Troloks jest rozpuszczalnym w wodzie analogiem α -tokoferolu szeroko stosowanym w badaniach właściwości przeciwutleniających. Wśród ekstraktów polifenolowych najwyższe wartości parametru TEAC otrzymano dla

zielonej herbaty, gdy utleniania indukowano związkiem AAPH ($422,87 \pm 13,40$ mM TE/100 g ś.m.) oraz jonami Fe^{2+} /askorbinian ($132,00 \pm 1,34$ mM TE/100 g ś.m.) oraz dla arniki, gdy utleniania indukowano związkiem AAPH ($157,21 \pm 8,13$ mM TE/100 g ś.m.) Najniższe wartości parametru TEAC, otrzymano w przypadku berberysu i derenia, gdy indukatorem utleniania były jony Fe^{2+} /askorbinian oraz promieniowanie UVC. W przypadku flawonoidów wartość parametru TEAC mniejsza od jedności oznacza, że wykazują one niższą w porównaniu z Troloksem aktywność przeciwutleniającą. TEAC mniejszy od jedności w przypadku naświetlania UVC błon liposomów EYPC uzyskano, gdy jako przeciwutleniacz stosowano: cyjanidynę, cyjanidyno-3-galaktozyd, kwas chlorogenowy, EGCG oraz epikatechinę. Wartość TEAC mniejszą od jedności otrzymano także, gdy utleniania lipidów indukowano jonami Fe^{2+} /askorbinian dla: cyjanidyno-3-galaktozydu, kwercetyno-3-galaktozydu oraz kwasu chlorogenowego. W pozostałej, przeważającej części przypadków wartość TEAC była większa od jedności, czyli badane flawonoidy były silniejszymi przeciwutleniaczami aniżeli Troloks. Gabrielska i Oszmiański [2005] sugerują, że niższa aktywność przeciwutleniająca antocyjanów w porównaniu z Troloksem może być spowodowana ich mniejszą stabilnością, gdy indukatorem utleniania był związek AAPH oraz promieniowanie UVC.

Dla określenia zdolności do wychwytywania wolnych rodników przez badane substancje przeciwutleniające przeprowadzono test z zastosowaniem modelowego stabilnego rodnika DPPH $\cdot$. Aktywność wychwytywania wolnych rodników DPPH $\cdot$ przez ekstrakty polifenolowe rosła według następującej relacji: dereń < mahonia < berberys < ogórecznik < arnika < zielona herbata. Aktywność przeciworodnikowa flawonoidów spełniała następującą zależność: kwas chlorogenowy < cyjanidyno-3-galaktozyd < cyjanidyna < kwercetyno-3-galaktozyd < kwercetyna < epikatechina < EGCG. Relacja aktywności przeciworodnikowej dla flawonoidów wybranych jako substancje odniesienia dla ekstraktów nie była zgodna z sekwencją otrzymaną dla tych ekstraktów. Wyniki te sugerują, że na aktywność przeciworodnikową, w stosunku do DPPH $\cdot$, badanych ekstraktów polifenolowych miały wpływ także inne aktywne składniki obecne w ekstraktach oprócz flawonoidów. Hu i Kitts [2001] oraz Yao i wsp. [2004] wykazali, że obecność reszty polifenolowej pierścienia B struktury flawonoidowej w cząsteczce EGCG wpłynęła na zwiększenie jego zdolności do wychwytywania wolnych rodników w porównaniu z epikatechiną.

Analizując dane literaturowe znaleźć można doniesienia o wykazanej wysokiej aktywności zielonej herbaty do wychwytywania wolnych rodników. W pracy McCune i Johns [2002], wykazano, że zielona herbata swoją aktywnością przeciwrodnikową przewyższała prawie czterokrotnie czarną herbatę, sześciokrotnie kawę oraz aż trzydziestosześciokrotnie czerwone wino. Świadczyła o tym najniższa w porównaniu z innymi rodzajami herbat, wartość parametru $IC_{50} = 6,67 \pm 0,14$ ppm. Autorzy ci sugerowali, że za wysoką aktywność przeciwutleniającą zielonej herbaty odpowiada jej wysoka zawartość katechin. Do podobnych wniosków doszli Yen i Chen [1995] badając zdolność zielonej herbaty do wychwytywania wolnych rodników DPPH[•] zarówno metodą spektrofotometryczną, jak i EPR. Wyższa aktywność zielonej herbaty, w porównaniu z czarną herbatą, spowodowana jest brakiem procesu fermentacji, przez co zielona herbata zachowuje prawie trzykrotnie więcej katechin [McCune i Johns 2002].

Skuteczność przeciwutleniającego działania substancji w stosunku do lipidów zorganizowanych w liposomy atakowane przez wolne rodniki wiąże się ze sposobem oddziaływania tych substancji z ochranianą błoną liposomów. Dlatego dla zbadania hydrofobowości badanych flawonoidów oraz ekstraktów polifenolowych przeprowadzono doświadczenia pozwalające na wyznaczenie współczynników podziału w dwóch układach modelowych błona liposomowa:faza wodna oraz oktanol:woda. Stwierdzono, że powinowactwo ekstraktów oraz flawonoidów do fazy oktanolowej jest ujemnie skorelowane z aktywnością przeciwutleniającą wobec peroksydacji indukowanej związkiem AAPH ($r = -0,696$ dla ekstraktów, $r = -0,642$ dla flawonoidów). Powinowactwo ekstraktów roślinnych do oktanolu również skorelowane jest ujemnie z aktywnością przeciwutleniającą, w odniesieniu do utleniania lipidów jonami Fe^{2+} /askorbinian ($r = -0,701$), oraz w przypadku naświetlania błon liposomów promieniowaniem UVC ($r = -0,810$). Ujemna wartość współczynnika korelacji ozaczała to, że im większe jest powinowactwo do fazy organicznej, tym niższa wartość IC_{50} . Badane ekstrakty wykazały następującą relację wzrostu hydrofobowości wyrażonej logP: dereń < mahonia < berberys < arnika < ogórecznik < zielona herbata. Dla ekstraktów z berberysu, derenia oraz mahonii otrzymano wartość logP ujemną, świadczącą o większym powinowactwie komponentów tych ekstraktów do fazy wodnej. Największe powinowactwo do oktanolu wykazał ekstrakt z zielonej herbaty. Wśród flawonoidów powinowactwo do fazy organicznej rosło w następującej relacji:

cyjanidyno-3-galaktozyd < cyjanidyna < kwas chlorogenowy < epikatechina < EGCG < kwercetyno-3-galaktozyd < kwercetyna. Należy zaznaczyć, że wartości ujemne logP otrzymano dla cyjanidyny oraz cyjanidyno-3-galaktozydu, będących składnikami ekstraktów z berberysu, derenia oraz mahonii. Dla których to ekstraktów uzyskano także ujemne wartości logP. Kwas chlorogenowy wykazał również wyższe powinowactwo do fazy wodnej. Może to sugerować, że za stosunkowo wysokie powinowactwo ekstraktu z arniki do oktanolu ($\log P = 0,30 \pm 0,06$) odpowiadały najprawdopodobniej inne substancje, oprócz kwasu chlorogenowego, obecne w ekstrakcie. Prawdopodobnie wpływała na to także obecność kwercetyny, która wykazała wysoką, dodatnią wartość logP ($1,43 \pm 0,07$). W pracy Nenadis i wsp. [2003] wyznaczono wartość współczynnika podziału oktanol:woda dla następujących związków: alfa-tokoferolu, Troloksu, BHT, BHA oraz TBHQ. Porównując wartości logP zamieszczone w pracy Nenadisa i wsp. [2003] z wynikami zamieszczonymi w tej pracy (rysunki 54 oraz 61) zauważono, że ekstrakty z berberysu, derenia oraz mahonii wykazywały zbliżone do Troloksu ($\log P = -0,310$) powinowactwo do oktanolu, natomiast EGCG oraz kwercetyno-3-galaktozyd do BHA ($\log P = 1,013$). Kwas chlorogenowy wykazywał zbliżone do kwasu kawowego powinowactwo do oktanolu ($\log P = -0,740$) [Nenadis i wsp. 2003]. Powinowactwo kwasów fenolowych do fazy wodnej potwierdzili Erleymann i wsp. [2004]. W pracy tych autorów przedstawiono podobną do otrzymanej w niniejszej pracy zależność logP dla flawonoidów. Według autorów hydrofobowość związków malała według następującej relacji: kwercetyna > EGCG > epikatechina > kwasy fenolowe. Foti i wsp. [1996] oraz Yang i wsp. [2001] zasugerowali, że wysoką wartość logP wykazują aktywne przeciwutleniacze i przedstawili teoretyczne wartości logP (obliczone za pomocą programu Pallas, CompuDrug Chemistry) oraz parametrów IC_{50} (wyznaczone doświadczalnie w odniesieniu do lipoprotein niskiej gęstości) dla szeregu flawonoidów w tym: EGCG, epikatechiny oraz kwercetyny. Według tych autorów wartość logP malała według następującej relacji: EGCG > kwercetyna > kwercetyno-3-galaktozyd > epikatechina. Wartość parametru IC_{50} natomiast wzrastała według ich obserwacji zgodnie z następującą kolejnością: kwercetyna < EGCG < epikatechina < kwercetyno-3-galaktozyd. Należy zaznaczyć, że wpływ na aktywność przeciwutleniającą związków oprócz hydrofobowości mają uwarunkowania geometryczne cząsteczek. Cząsteczki o rozbudowanej przestrzennej strukturze wykazują niższą aktywność przeciwutleniającą, o czym wspomniano już powyżej [Yang i wsp.

2001]. Bors i wsp. [2000] zasugerowali natomiast, że zdolność przeciwutleniającego działania flawonoidów oraz mechanizm tego działania jest efektem synergistycznego działania wielu czynników.

Opisana w rozdziale 4.4.11 metoda fluorymetryczna z zastosowaniem sondy DPH do wyznaczenia powinowactwa związków do błon liposomów z zależności Sterna-Volmera, jest dość powszechnie stosowana w literaturze. W metodzie tej powinowactwo zostało wyrażone jako stała dysocjacji - K_d . Wysoka wartość stałej dysocjacji w błonie liposomów świadczy o niskim powinowactwie badanego związku do błon liposomów. Sądzi się, że wysoka wartość stałej K_d może świadczyć o małej zdolności związków do ochrony błon tych liposomów przed procesami peroksydacji, a także niewydajnym procesie zamykania tych związków we wnętrzu liposomów. Z badań dotyczących stałych dysocjacji ekstraktów w błonach liposomów wynika istnienie wysokiej korelacji między wartościami tych stałych, a parametrem IC_{50} ($r = 0,903$ (AAPH), $r = 0,670$ (Fe^{2+} /askorbinian), $r = 0,951$ (UVC)). Podobnie wysoką korelację, dla katechin, pomiędzy ich powinowactwem do błon liposomów, a aktywnością przeciwutleniającą wobec liposomów, których utleniania indukowano związkiem AAPH, zaobserwowali Laporta i wsp. [2007]. Autorzy ci wyznaczyli współczynnik podziału w układzie błona liposomów:woda metodą fluorymetryczną z zastosowaniem liposomów LUV uformowanych z DMPC. Przedstawiony wzrost hydrofobowości katechin był natomiast zgodny z następującą relacją: katechina < epikatechina < EGCG < galusan epikatechiny [Laporta i wsp. 2007].

Paiva-Martins i wsp. [2003] zasugerowali, że lipofilowe przeciwutleniacze mogą wychwytywać, zarówno rodniki nadtlenkowe pochodzące ze środowiska wodnego, jak również nadtlenki lipidów znajdujące się w hydrofobowym rdzeniu błony.

Badane w tej pracy ekstrakty roślinne wykazały zróżnicowane powinowactwo do błon liposomów EYPC. Stała dysocjacji wzrastała w następującej relacji: zielona herbata < arnika < ogórecznik < berberys < mahonia < dereń. Wśród flawonoidów powinowactwo do błony liposomów malało (wartość K_d rosła) w następującej relacji: kwercetyna > EGCG > epikatechina > kwercetyno-3-galaktozyd > cyjanidyna > cyjanidyno-3-galaktozyd > kwas chlorogenowy. Z analizy wartości $\log P$ oraz K_d dla ekstraktów roślinnych zauważono wysoką korelację między tymi parametrami ($r = -0,924$). Wartości parametrów $\log P$ oraz stałej dysocjacji nie wykazały niestety korelacji w przypadku flawonoidów. Może to sugerować wniosek, że podczas wyznaczania współczynnika podziału polifenoli pomiędzy oktanol i wodę budowa

cząsteczkowa nie odgrywała istotnej roli. Inaczej było gdy wyznaczano stałą dysocjacji w układzie liposomy EYPC:bufor, gdzie budowa cząsteczkowa miała istotny wpływ na wartość stałej dysocjacji.

Zaobserwowano, że glikozydy wykazywały mniejsze powinowactwo do błon liposomów oraz fazy organicznej jaka jest oktanol (wyższą wartość K_d , oraz mniejszą wartość $\log P$) w porównaniu z aglikonami. Podobne wnioski zasugerowali van Dijk i wsp. [2000], Tammela i wsp. [2004] oraz Ratman i wsp. [2006]. Ratman i wsp. [2006], analizując wpływ glikozylacji flawonoidów na ich właściwości, zauważyli na przykładzie kwercetyny i kwercetyno-3-ramnoglukozydu, że aglikon wykazuje wyższą wartość $\log P$, czyli większe powinowactwo do oktanolu w porównaniu z glikozydami. Flawonoidy posiadające wiele grup hydroksylowych w swoich cząsteczkach wykazywały mniejszą asocjację do błony w wyniku tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi, a polarną częścią lipidu [van Dijk i wsp. 2000, Erleiman i wsp. 2004]. Iftime i wsp. [2010] sugerowali, że związek EGCG oraz inne katechiny wykazywały wysokie powinowactwo do błon lipidowych dzięki tworzeniu wiązań wodorowych z polarnymi grupami lipidów, a w szczególności z trawami lipidowymi bogatymi w sterole. Z drugiej jednak strony sady się także, że hydrofobowość flawonoidów maleje wraz ze wzrostem liczby grup hydroksylowych w cząsteczce [van Dijk i wsp. 2000]. Ważnym parametrem, warunkującym powinowactwo cząsteczek do błony liposomów, jest ich przestrzenna struktura. Hendrich [2006] stwierdził, że flawanony są bardziej hydrofobowe w porównaniu z flawonolami (o takim samym stopniu hydroksylacji), a ich powinowactwo do błon jest wyższe. Obserwacja ta potwierdza wcześniejsze sugestie dotyczące wpływu struktury przestrzennej cząsteczki na jej hydrofobowość. Flawonole, jak np. kwercetyna, mają płaską strukturę cząsteczki, przez co łatwiej penetrują do błon. Kaijya i wsp. [2002] zasugerowali, że na hydrofobowość i powinowactwo katechin do błon lipidowych ma wpływ ilość grup OH w pierścieniu B, obecność reszty kwasu galusowego oraz przestrzenna struktura pierścienia C. Stwierdzili oni, że na powinowactwo flawonoidów do błon ma wpływ także stężenie soli w środowisku wodnym, ładunek elektryczny błony oraz obecność innych flawonoidów. Zaobserwowali, że w obecności epikatechiny związek EGCG wykazywał większe powinowactwo do błony liposomów, aniżeli pod jej nieobecność [Kaijya i wsp. 2002].

W podsumowaniu poglądów na temat roli oddziaływań flawonoidów z błonami lipidowymi można stwierdzić, że istnieją dwa sposoby opisu tych interakcji. Pierwszy,

wspomniany powyżej, to adsorpcja na powierzchni błony poprzez oddziaływania hydrofilowe flawonoidów z polarnymi główkami lipidów. Ma to miejsce na granicy faz woda-lipid. Drugi sposób oddziaływania flawonoidów z błoną to wnikanie cząsteczek bardziej hydrofobowych w niepolarne, hydrofobowe rejony błony [Verstraeten i wsp. 2003, Erlejmán i wsp. 2004]. Erlejmán i wsp. [2004] twierdzą, że za wyższą aktywność przeciwutleniającą związku z grupy polifenoli odpowiada jego zdolność do wiązania się z polarnymi rejonami błony oraz wzrost jego lokalnego stężenia w rejonie woda-lipid.

Aktywność biologiczna ekstraktów roślinnych, jak się powszechnie uważa związana jest z zawartością substancji aktywnych w tych ekstraktach. Badania zawarte w tej pracy wykazały, że zarówno zawartość polifenoli, jak i flawonoidów w ekstraktach roślinnych malała w następującym porządku: zielona herbata > arnika > ogórecznik > berberys > mahonia > dereń. Zawartość flawonoidów była silnie skorelowana z zawartością polifenoli ($r = 0,965$). Zawartość polifenoli ogółem dla derenia ($339,36 \pm 4,59$ mg GAE/100g ś.m.) była porównywalna z wartością otrzymaną w pracy Marinova i wsp. [2005], która wynosiła 432,0 mg GAE/100g ś.m. Podobny poziom zawartości polifenoli dla derenia, od 281 do 579 mg GAE/100g ś.m., otrzymano w pracy Turala i wsp. [2008]. Zawartość antocyjanów, wyznaczona przez tych badaczy, dla derenia była wyższa w porównaniu z wartością otrzymaną w niniejszej pracy i mieściła się w zakresie od 112 do 292 mg C3GE/100g ś.m. [Tural i Koca 2008].

Oznaczanie antocyjanów wykonywano dla ekstraktów z berberysu, derenia i mahonii. Największą zawartość antocyjanów wykazała mahonia ($226,63 \pm 4,46$ mg C3GE/100g ś.m.), natomiast znacznie mniejszą posiadał berberys oraz dereń (ponad 45 mg C3GE/100g ś.m.). Zawartości antocyjanów otrzymane w niniejszej pracy dla berberysu, derenia oraz mahonii porównano z wynikami oznaczeń antocyjanów w innych roślinach zamieszczonych w pracy Benvenuti i wsp. [2004]. Zawartość antocyjanów w ekstrakcie z mahonii była zbliżona do zawartości tych związków w czarnych jagodach - około 200 mg C3GE/100g ś.m.. Wyższą zawartość wykazał jedynie ekstrakt z aronii ($460,5 \pm 2,9$ mg C3GE/100g ś.m.) [Benvenuti i wsp. 2004]. Wysoka zawartość antocyjanów w owocach tych roślin powoduje ich ciemnofioletową barwę. Mniejsza w porównaniu z mahonią, zawartość antocyjanów w owocach berberysu oraz derenia skutkuje tym, że są one czerwone. Zawartość antocyjanów w tych owocach jest niższa w porównaniu z jeżyną, ale większa aniżeli w malinie [Benvenuti i wsp. 2004]. Istnieją doniesienia literaturowe sugerujące, że to właśnie antocyjany są najbardziej aktywnymi biologicznie związkami w ekstraktach

z berberysu, derenia oraz mahonii, które odpowiadają za ich aktywność przeciwutleniającą [Jayaprakasam i wsp. 2005, Vareed i wsp. 2006]. Vareed i wsp. [2006] zasugerowali, że w owocach *Cornus species* jest od 10 do 15 razy więcej antocyjanów w porównaniu z innymi owocami wykorzystywanymi jako źródło tych związków. Przyczyną różnic w zawartościach zarówno polifenoli, flawonoidów, jak również antocyjanów mogą być różnorodne czynniki środowiskowe, w których roślina wzrastała.

Zauważono korelację pomiędzy zawartością antocyjanów w ekstraktach, a ich właściwościami ochronnymi wobec błon liposomów EYPC, poddanych procesom peroksydacji jonami Fe^{2+} /askorbinian ($r = -0,982$). W przypadku peroksydacji lipidów indukowanej promieniowaniem UVC zaobserwowano niewielki związek między zawartością polifenoli, flawonoidów a parametrem IC_{50} ($r = -0,606$, $r = -0,662$, odpowiednio). Przyczyną może być to, że odczynnik Folina-Ciocalteu może reagować niespecyficycznie z innymi obecnymi w ekstraktach substancjami aniżeli polifenole [Wong i wsp. 2006b]. Opinie na temat istnienia korelacji pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą z zawartością polifenoli są różne. Wysoką liniową korelację pomiędzy tymi dwoma parametrami zasugerowali Luo i wsp. [2004], Djeridane i wsp. [2006] oraz Katalinic i wsp. [2006], natomiast niską korelację między tym parametrami wykazali Czapeccka i wsp. [2005] oraz Wong i wsp. [2006a]. Jeszcze inni autorzy prac stwierdzili brak korelacji pomiędzy zawartością polifenoli a aktywnością przeciwutleniającą [Kähkönen i wsp. 1999]. Słaba korelacja pomiędzy zawartością polifenoli, flawonoidów oraz antocyjanów, a parametrem IC_{50} (w przypadku inhibicji peroksydacji błon liposomów gdy induktorem jest promieniowanie UVC), może świadczyć o tym, że na aktywność przeciwutleniającą badanych substancji miały wpływ inne czynniki, w tym między innymi hydrofobowość tych substancji.

W celu określenia zdolności badanych ekstraktów i flawonoidów do redukcji jonów żelaza (z formy Fe^{3+} do Fe^{2+}) przeprowadzono badania z zastosowaniem metody FRAP. Ekstrakty wykazywały wzrastającą zdolność do redukcji jonów żelaza w następującej kolejności: mahonia < dereń < berberys < ogórecznik < arnika < zielona herbata. Wartość parametru FRAP dla flawonoidów rosła w następującej kolejności: kwercetyno-3-galaktozyd < kwas chlorogenowy < epikatechina < cyjanidyno-3-galaktozyd < EGCG < kwercetyna < cyjanidyna.

Zauważono, że aktywność redukcyjną jonów żelaza (FRAP), jak również zdolność do wychwytywania wolnych rodników DPPH $\cdot$, była bardzo wysoka zarówno

w przypadku polifenoli obecnych w ekstraktach ($r = 0,968$, $r = 0,995$), jak i flawonoidów ($r = 0,872$, $r = 0,957$). Podobnie wysoką korelację pomiędzy parametrem FRAP, a zawartością polifenoli oraz flawonoidów wykazano w pracy Jabłońska-Ryś [2009]. Katalinic [2006] oraz Wong i wsp. [2006a] sugerują natomiast brak zależności pomiędzy zdolnością flawonoidów do redukowania jonów Fe^{3+} , a ich aktywnością przeciwutleniającą. Należy dodać, że zawartość polifenoli oraz flawonoidów w ekstraktach, w przypadku tej pracy, wykazywała dość dobrą korelację z wartością $\log P$ ($r = 0,705$, $r = 0,704$), oraz słabszą z wartościami K_d ($r = -0,618$, $r = -0,661$).

Ekstrakty z berberysu, derenia oraz mahonii, a także substancje będące głównymi komponentami tych ekstraktów przebadano pod względem zdolności do kompleksowania jonów Fe^{2+} . W procesie miareczkowania ekstraktów jonami Fe^{2+} zaobserwowano spadek absorbancji głównych pasm pochłaniania, największy dla mahonii ($\Delta A = 1,41$) oraz przesunięcie batochromowe pików $\Delta \lambda = 3$ nm, co świadczy o procesie kompleksowania jonów Fe^{2+} . W przypadku cyjanidyny w wyniku kompleksowania jonów nastąpiło obniżenie absorbancji głównego pików ($\Delta A = 1,46$) oraz wzrost absorbancji pików pochodzącego od powstałego kompleksu flawonoid : Fe^{2+} przy $\lambda_{\text{max}} = 650$ nm o $\Delta A = 0,211$. Zaobserwowano także pojawienie się punktu izozobestycznego, który wskazuje na istnienie równowagi w roztworze pomiędzy formą wolną cyjanidyny oraz skompleksowaną [Cornard i wsp. 2001]. Podczas miareczkowania cyjanidyno-3-galaktozydu jonami Fe^{2+} zaobserwowano obniżenie absorbancji pików pochodzącego od tego antocyjanu o $\Delta A = 1,21$ oraz niewielki wzrost absorbancji, o $\Delta A = 0,04$, pików pochodzącego od powstałego kompleksu flawonoid: Fe^{2+} (przy $\lambda = 650$ nm). Z porównania efektów kompleksowania wywnioskowano, że cyjanidyna wykazała silne zdolności do kompleksowania jonów żelaza, podczas gdy jej pochodna cukrowa znacznie słabiej kompleksowała te jony. Antocyjany posiadają w swojej cząsteczce dwa pierścienie aromatyczne A i B bogate w elektrony π , w wyniku ich delokalizacji mogą powstawać kompleksy. Nowe pasmo pochodzące od kompleksu związane jest z przejściem zwanym „przesunięcie ładunku” (ang. charge transfer) [Corm i wsp. 1991]. Proces chelatowania metali może dotyczyć jonów metali przejściowych, takich jak żelazo czy miedź, a także metali ciężkich np. rtęci. Schemat możliwych miejsc wiązania metali do cząsteczki flawonoidów, w tym do związków antocyjanowych, przedstawiono na rysunku 24. W cząsteczkach cyjanidyny oraz cyjandyno-3-galaktozydu jedynym miejscem, do którego może zostać związany jon metalu jest grupa orto-dihydroksylowa w pozycji 3, 4 pierścienia B. Gabrielska

[2001] sugeruje, że flawonoidy, które wykazują dużą zdolność kompleksowania metali mogą znaleźć zastosowanie jako antidotum w zatruciach ludzi, szczególnie jonami pierwiastków ciężkich. Jednym z przykładów flawonoidów, opisanych w literaturze, wykazujących zdolności chelatacyjne należy kwercetyna. Przykłady zdolności chelatacyjnej kwercetyny w stosunku do jonów Fe^{2+} oraz organicznych form ołowiu i cyny przedstawiono w pracach Gabrielska [2001] oraz Guo i wsp. [2007]. Istnieją doniesienia literaturowe o niskiej zdolności do kompleksowania jonów żelaza oraz miedzi przez epikatechinę [Kostyuk i wsp. 2004]. Wykazano natomiast, że kompleksy, np. kwercetyny oraz katechin z jonami Fe^{3+} są bardziej efektywne do wychwytywania wolnych rodników aniżeli ich formy wolne [Zhao i wsp. 1998].

Uważa się, że zdolność do kompleksowania jonów żelaza przez flawonoidy należy do mechanizmów ich działania przeciworodnikowego. Wolne jony żelaza (Fe^{2+} oraz Fe^{3+}) w bardzo niskich stężeniach, poniżej 10^{-18} M, są toksyczne dla organizmu. Mogą bowiem katalizować reakcję Fentona, w wyniku której powstają rodniki hydroksylowe. Komórkowe przeciwutleniacze, takie jak np. askorbinian (AsCH^- i NADH) są zdolne do przekształcania jonów $\text{Fe}^{3+}(\text{Cu}^{2+})$ do $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^+)$ i w obecności nadtlenu wodoru katalizować reakcję Fentona. Związki polifenolowe poprzez wiązanie jonów metali wpływają na homeostazę np. żelaza, która odgrywa ważną rolę w kondycji zdrowotnej organizmu. Zdania na temat wpływu zdolności chelatowania metali przez flawonoidy na ich aktywność przeciwutleniającą są jednak podzielone. Van Acker i wsp. [1998] zasugerowali, że zdolność do chelatowania metali przez flawonoidy nie wpływa na ich aktywność przeciwutleniającą. Lopes i wsp. [1999] oraz Sugihara i wsp. [2001] stwierdzili natomiast, że zdolność ta ma działanie prewencyjne wobec tworzenia wolnych rodników.

Kolejnym etapem badań niniejszej rozprawy było określanie właściwości fizycznych liposomów utworzonych z różnych lipidów. Badania te obejmowały pomiar:

- przepuszczalności błon liposomów oraz efektywności zamykania znacznika fluorescencyjnego w badaniach, w zależności od długości oraz stopnia nasycenia łańcucha acylowego lipidów, z których formowano liposomy,
- rozmiarów liposomów oraz płynności błony liposomów w zależności od metody formowania pęcherzyków lipidowych i od długości oraz od stopnia nasycenia łańcucha acylowego lipidów,

- procentowego zamykania wybranych przeciwutleniaczy w liposomach uformowanych z różnych lipidów w zależności od składu lipidowego oraz obecności cholesterolu.

Pomiar przepuszczalności liposomów przeprowadzono metodą fluorescencyjną z zastosowaniem znacznika – karboksyfluoresceiny (CF). Jest to hydrofilowy marker, który zamknięty w liposomach w wysokich stężeniach (100 – 200 mM) praktycznie nie fluoryzuje. Obserwowana fluorescencja markera w zawiesinie liposomów pochodziła od cząsteczek fluoroforu uwolnionych z wnętrza pęcherzyków do środowiska wodnego. Znaczniki fluorescencyjne (karboksyfluoresceina lub kalceina) oraz reakcje enzymatyczne do pomiaru wypływu glukozy z wnętrza liposomów stosowane są w badaniach:

- przepuszczalności błon liposomów [Silvander i wsp. 2003],
- stabilności liposomów [Allen i Cleland 1980, <http://www.ibmb.uni.wroc.pl/studia/6.pdf>],
- określania objętości zamknięcia [<http://www.ibmb.uni.wroc.pl/studia/6.pdf>],
- procentowej efektywności zamykania [Yokoyama i wsp. 2002],
- interakcji liposomów z komórkami oraz fuzji pęcherzyków [<http://www.ibmb.uni.wroc.pl/studia/5.pdf>],
- wpływu substancji na przepuszczalność błon liposomów w tym na ich destrukcję [Subbarao i MacDonald 1994, Mizoguchi i Hara 1996, Nagahama i wsp. 1996, Hofmann i wsp. 2000, Yokoyama i wsp. 2002].

Przepuszczalność błon liposomów wyznaczano poprzez procentowy wypływ CF wyliczony na podstawie wzoru zamieszczonego w rozdziale 4.4.12. Analizując dane przedstawione na rysunku 63a oraz zamieszczone w załączniku 18 stwierdzono, że przepuszczalność błon liposomów maleje wraz ze wzrostem długości łańcucha acylowego lipidu. Obserwuje się sześciokrotny spadek przepuszczalności błon uformowanych z lipidu zawierającego w łańcuchu węglowodorowym 22 atomy węgla w stosunku do dipalmitoilofosfatydylochliny zawierającej 16 atomów węgla. Na podstawie analizy danych (rysunek 63b oraz załącznik 19) można stwierdzić, że przepuszczalność błon liposomów wzrasta wraz z obecnością wiązań nasyconych w łańcuchu acylowym w cząsteczkach lipidów. Liczba wiązań podwójnych w cząsteczkach lipidów znacznie wpłynęła na przepuszczalność błon utworzonych z cząsteczek zawierających 3 wiązania podwójne oraz 18 atomów węgla w łańcuchu

(18:3). W przypadku diarachidonoilofosfatydylocholiny (20:4) błony wykazały największą przepuszczalność, jednak długie łańcuchy acylowe spowolniły wpływ CF. W sytuacji, gdy liposomy uformowano z fosfolipidów wyekstrahowanych z naturalnego surowca - EYPC czy HSPC, zawierających w swoim składzie mieszaninę zarówno nasyconych, jak i nienasyconych lipidów różniących się długością łańcuchów acylowych, uzyskano relatywnie wysokie wartości procentowego wpływu CF rzędu 2-3 %. Silvander i wsp. [2003] zauważyli, że wysoką przepuszczalność błon liposomów utworzonych z EYPC zniwelować można dodatkiem DSPC. Ten lipid o nasyconych wyprostowanych łańcuchach węglowodorowych, zlokalizowany pomiędzy różnie zorientowanymi łańcuchami EYPC, zwiększa uporządkowanie tych łańcuchów arylowych, co skutkuje większą szczelnością błony [Silvander i wsp. 2003]. Wpływ składu lipidowego na przepuszczalność błon pęcherzyków lipidowych badali także Nagahama i wsp. [1996]. Autorzy te pracy wykazali jak zmieniała się przepuszczalność błon uformowanych z lipidów różniących się długością łańcucha alkilowego oraz stopniem jego nasycenia, pod wpływem alfa toksyn, wydzielanych przez *Clostridium pefringens*. Te zależności (zarówno wpływu długości łańcucha, jak również stopnia jego nasycenia na przepuszczalność błon pęcherzyków lipidowych) były zgodne z uzyskanymi w tej pracy. Dodatkowo autorzy wykazali, że obecność dwuwartościowych kationów zwiększała przepuszczalność błon liposomów. Innym sposobem badania przepuszczalności błon liposomów jest pomiar penetracji przez błony glicerolu lub erytrytolu. W pracy De Gier i wsp. [1968] stosując tę metodę zaobserwowali podobny wpływ budowy cząsteczki lipidu na przepuszczalność błon uformowanych liposomów. Zauważono także, że dodatek cholesterolu zwiększał szczelność liposomów [De Gier i wsp. 1968]. Obserwacja tych autorów, o wpływie cholesterolu na szczelność błon liposomów, była sprzeczna z wynikami zamykania przeciwutleniaczy otrzymanymi w tej pracy, ponieważ dodatek cholesterolu w zasadzie zmniejszał wydajność ich kapsulacji z wyjątkiem liposomów z EYPC z dodatkiem cholesterolu. W pracy Inoue [1973] zaobserwowano, że dodatek 20 mol % cholesterolu do liposomów formowanych z DPPC powodował wzrost przepuszczalności błon liposomów. Obecność w błonie liposomów 20 mol % cholesterolu zwiększała dodatkowo wpływ temperatury na szczelność tych błon. W temperaturze powyżej temperatury przejścia fazowego lipidów (T_{pf}) budujących liposom, błona wykazywała dużą przepuszczalność. W przypadku, gdy dodatek cholesterolu przewyższał 33 mol %, wzrost temperatury nie wpływał na przepuszczalność błon liposomów. Podobne

zależności otrzymali Allen i Cleland [1980] badając wpływ cholesterolu na szczelność błon liposomów. Było to powodem dodawania 40 mol % cholesterolu w badaniach efektywności zamykania przeciwutleniaczy. Obecność cholesterolu zmniejszyła przepuszczalność błon liposomów, gdy te znajdowały się w temperaturze poniżej temperatury przemiany fazowej lipidów. Cholesterol miał również silniejszy wpływ na przepuszczalność błon liposomów regulowaną temperaturą w przypadku liposomów utworzonych z lipidów nasyconych w porównaniu z nienasyconymi [Inoue 1973].

Metodę fluorescencyjną z zastosowaniem karboksyfluoresceiny (CF) wykorzystano również do pomiaru efektywności zamykania tego znacznika. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem długości łańcucha acylowego efektywność zamykania CF malała pomimo, że wpływ CF również malał, natomiast wzrastały rozmiary liposomów. Obniżenie efektywności zamykania CF przy jednoczesnym obniżeniu procentowego wpływu może być spowodowane tym, że wraz ze wzrostem liczby atomów węgla w łańcuchu acylowym lipidów rosła grubość dwuwarstwy, a niekoniecznie hydrofilowe wnętrze liposomów, do której powinowactwo wykazywała karboksyfluoresceina. Dla liposomów utworzonych z lipidów zawierających wzrastającą liczbę wiązań podwójnych w łańcuchu efektywność zamykania CF wzrastała w niewielkim stopniu. W przypadku liposomów uformowanych z EYPC otrzymano bardzo niski procent zamykania - 0,17 %. Wartość ta zbliżona jest do otrzymanej w pracy Yokoyama i wsp. [2002]. Autorzy wyżej wymienionej pracy zaobserwowali jednak, że efektywność kapsulacji CF jest wyższa dla liposomów otrzymanych metodą faz odwróconych (1,22 %), aniżeli metodą proponowaną przez Bahghama (0,12 %). Metoda Bahghama polegała na spontanicznym tworzeniu pęcherzyków w wyniku nawadniania suchego filmu lipidowego. Metoda ta pomimo niższej efektywności zamykania, posiada wiele zalet: jest metodą prostą i taną w realizacji, nie wymaga specjalistycznego sprzętu.

Kolejnym badaniem fizycznych właściwości pęcherzyków lipidowych w zależności od lipidu tworzącego błonę, oraz od zastosowanej metody otrzymywania liposomów był pomiar płynności błon, który wykonywano metodą fluorymetryczną. Zastosowano sondę DPH, która lokuje się w hydrofobowym wnętrzu błony [Lakowicz 1999]. Dla uzyskania dobrego, równomiernego rozkładu molekuł DPH, dodawano ją do lipidu, przed jego hydratacją [Arora i wsp. 2000].

Mierzony wzrost anizotropii fluorescencji sondy DPH świadczył o usztywnieniu mikrootoczenia sondy, czyli o wzroście jego sztywności, natomiast spadek anizotropii

sondy sugerował o wzroście płynności jej otoczenia [Arora i wsp. 2000]. Termin płynność odnosi się do względnej swobody ruchu cząsteczek lipidów w błonach [Arora i wsp. 2000]. Pęcherzyki lipidowe uformowane metodą sonifikowania z lipidów posiadających długie łańcuchy acylowe wykazały dużą płynność. Największą płynnością (niską wartością anizotropii fluorescencji) charakteryzowały się błony liposomów uformowanych z lipidów zawierających nienasycone kwasy tłuszczowe, oraz te, które w temperaturze pomiaru znajdowały się w fazie ciekłokrystalicznej (12:0, EYPC, HSPC) lub w pobliżu temperatury przejścia fazowego lipidu (14:0). Dla liposomów otrzymanych metodą kalibracji przez filtry poliwęglanowe formowanych z lipidu 14:0 wartość anizotropii fluorescencji wynosiła 0,12. W przypadku sonifikowanych pęcherzyków lipidowych utworzonych z lipidu 16:0 wartość anizotropii fluorescencji sondy DPH w tej błonie wynosiła 0,22. Wartość ta zgodna była z wynikami zawartymi w pracy Bhattacharya i Bajaj [2008]. Obecność w cząsteczce lipidu wiązań nienasyconych powodowała obniżenie temperatury przejścia fazowego lipidu poniżej temperatury pomiaru, przez co błony liposomów wykazały większą płynność, na co wskazywała zmniejszona anizotropia fluorescencji sondy DPH.

Dla zbadania wpływu przeciwutleniaczy na płynność błon liposomów utworzonych z DPPC zastosowano sondę TMA-DPH. Sonda TMA-DPH jest cząsteczką zakotwiczoną się na poziomie czwartego atomu węgla łańcucha alkilowego z uwagi na jej elektrostatyczne oddziaływania z ujemną grupą fosforanową w polarnej części dwuwarstwy [Engelke i wsp. 2001]. Kationowa pochodna sondy DPH, ze względu na jej płytsze lokowanie w dwuwarstwie, dostarcza informacji na temat wiązania się substancji poprzez oddziaływania wodorowe z hydrofilowym rejonem błony oraz ich penetrację na głębokość granicy faz.

Badania wpływu ekstraktów polifenolowych na płynność błon liposomów z użyciem sondy TMA-DPH wykazały, że ekstrakty z arniki oraz zielonej herbaty usztywniały błonę DPPC w rejonie lokowania się sondy TMA-DPH. Takie rezultaty nasunęły wniosek, że ekstrakty arniki oraz zielonej herbaty lokowały się głównie w powierzchniowym, hydrofilowym rejonie błony. Rozlokowanie się ekstraktów na powierzchni błony powodowało powstanie swoistej bariery chroniącej błonę przed atakiem wolnych rodników. Taka lokalizacja flawonoidów w błonie może ze względów geometrycznych utrudniać dyfuzję wolnych rodników do wnętrza błony, przez co obniżać w niej kinetykę reakcji wolnorodnikowych [Arora i wsp. 2000]. Może to być przyczyną najwyższej, spośród badanych ekstraktów polifenolowych, aktywności

przeciwutleniającej tych ekstraktów, to jest z zielonej herbaty oraz arniki. W przypadku flawonoidów, związek EGCG usztywniał błonę lipidową w strefie hydrofilowo-hydrofobowym (względna anizotropia wrosła o około 15 % dla 8 μM stężenia EGCG). Tsuchiya [2001] wykazał analogiczne działanie związku EGCG w stężeniach od 5 do 100 μM) zmniejszające płynność błony.

Dla utworzenia nośników liposomowych przeciwutleniaczy wybrano nowatorską metodę polegającą na poddaniu liposomów otrzymanych w wyniku cyklicznego zamrażania i rozmrażania (ang. freeze-thaw) w następnym etapie ich sonifikowaniu.

Metoda FAT powoduje powstawanie liposomów wielowarstwowych MLV (ang. multi lammelar vesicles). Korzystne jest jednak zredukowanie wielu warstw lipidowych liposomów MLV za pomocą np. sonifikacji czy kalibracji przez filtry o określonej średnicy porów. Wielokrotna destrukcja dwuwarstwy przez szybkie zamrażanie i ponowne jej tworzenie w procesie rozmrażania zwiększa wydajność zamykania substancji w tych tworzonych strukturach [Kozubek 2004].

Liposomy formowane metodą FAT, a następnie sonifikowane (FAT-s) są mniejsze, aniżeli liposomy uzyskane tylko w wyniku sonifikowania czy kalibrowania.

W mniejszej pracy substancjami zamykanymi w pęcherzykach lipidowych były ekstrakty z zielonej herbaty oraz arniki, a także flawonoidy takie jak: EGCG, epikatechina oraz kwercetyna. Związki te wybrano ze względu na wysoką aktywność przeciwutleniającą oraz stosunkowo dużą hydrofobowość, czyli wysokie powinowactwo do błon liposomów (niska wartość stałej dysocjacji K_d). W procesie tworzenia nośnika liposomowego przeciwutleniaczy ważne było dodanie zamykanego związku w odpowiednim momencie procedury. Substancje rozpuszczalne w wodzie dodawano podczas hydratowania suchego filmu lipidowego, natomiast soluty rozpuszczalne w lipidach dodawano do roztworu lipidów przed odparowaniem rozpuszczalnika organicznego, czyli przed utworzeniem filmu lipidowego. Związek EGCG, epikatechinę, a także ekstrakty z zielonej herbaty oraz arniki rozpuszczono w buforze TRIS-HCl, pH=7,4. Roztworami tymi hydratowano suchy film lipidowy. Kwercetynę, która nie jest rozpuszczalna w buforze, zastosowano jako roztwór etanolowy dodając do zhydratowanego buforem lipidu. Liposomy uformowano z trzech lipidów: DPPC, HSPC oraz EYPC. Dodatkowo zbadano także wpływ cholesterolu na efektywność zamykania przeciwutleniaczy. Przy wyborze lipidów zwrócono uwagę na

to, aby liposomy charakteryzowały się umiarkowaną przepuszczalnością oraz wysoką efektywności zamykania markera hydrofilowego – CF.

Najefektywniej proces zamykania przeciwutleniaczy przebiegał w pęcherzykach lipidowych uformowanych z DPPC, następnie HSPC, a najsłabiej z EYPC. Dodatek 40 mol % cholesterolu do błon znacząco obniżył procent zamykania. Wyjątek stanowiły liposomy uformowane z EYPC, w których obecność cholesterolu zwiększyła efektywność zamykania. Dwojaki efekt cholesterolu mógł być spowodowany różną temperaturą przemiany fazowej lipidów tworzących liposomy. Najwyższą efektywność zamykania przeciwutleniaczy otrzymano w przypadku liposomów utworzonych z DPPC. Najniższe wartości procentowego zamykania otrzymano dla liposomów utworzonych z EYPC. Dla pęcherzyków lipidowych uformowanych z DPPC najwyższą efektywność otrzymano w przypadku zamykania związku EGCG ($76,31 \pm 2,20$ %), następnie epikatechiny ($55,55 \pm 1,47$ %) oraz kwercetyny ($53,78 \pm 1,18$ %). Niższe procenty zamykania uzyskano dla liposomów DPPC z ekstraktami z zielonej herbaty ($33,29 \pm 0,64$ %) oraz arniki ($31,49 \pm 1,28$ %). Zaobserwowano, że ekstrakty polifenolowe wykazały niższą efektywność zamykania w porównaniu z flawonoidami, niezależnie od składu lipidowego.

Zagadnienie stworzenia nośników liposomowych aktywnych biologicznie substancji zostało podjęte ze względu na szerokie zapotrzebowanie aplikacyjne tych struktur. Literatura opisuje próby kapsulacji różnych substancji aktywnych biologicznie w liposomach. Dotyczy to zarówno substancji naturalnych, w tym flawonoidów, ale przede wszystkim leków między innymi amfoterycyny B [Moribe i wsp. 1999], ketoprofenu i ibuprofenu [Nii i Ishii 2005] oraz cisplatyny [Hwanh i wsp. 2007].

Do flawonoidów, których liposomowe nośniki próbowano stworzyć należą między innymi: procyjanidyny [Petrovic i wsp. 2004]. Opisywana jest też kapsulacja katechin, gdzie dodawano katechiny do hydratowania lipidu i w wyniku sonifikowania osiągnięto od 38,7 do 93% kapsulacji [Fang i wsp. 2006, Lee i wsp. 2008]. Fang i wsp. [2006] prowadzili kapsulację katechin w liposomach utworzonych z EYPC z dodatkiem cholesterolu, anionowego surfaktantu - kwasu deoksycholowego oraz niejonowego detergentu Tween 80. Otrzymana wydajność kapsulacji (99,6 % dla EGCG oraz 31,9 % dla epikatechiny) była wyższa dla EGCG, natomiast dla epikatechiny zbliżona do otrzymanej w niniejszej pracy (22,26 % dla EGCG oraz 23,45 % dla epikatechiny). Fang i wsp. [2006] wykazali, że kalibrowanie zawiesiny liposomów zamiast jej sonifikowanie, nie wpływało na zwiększenie efektywności zamykania aktywnych

substancji wewnątrz pęcherzyków lipidowych. Dodatek kwasu deoksycholowego nie wpłynął na wzrost zamykania związku EGCG, natomiast zwiększył efektywność w przypadku epikatechiny do 62,7 %. Tween 80 zmniejszył procent zamykania związku EGCG do 84,6 %, a zwiększył w przypadku epikatechiny do 57,8 %. Fang i wsp. [2006] zasugerowali, że lipidowy skład liposomów odgrywał ważną rolę w skuteczności transdermalnej aplikacji katechin. Włączenie anionowych środków powierzchniowo-czynnych, takich jak kwas deoksycholowy (DA) czy dicetyl fosforanu (DP) w procesie formowania liposomów oraz zastosowanie etanolu (do 15%) zwiększyło wydajność zamykania (+)-katechiny prawie 7-krotnie w porównaniu z kontrolą, zawierającej EYPC oraz cholesterol w stosunku wagowym 4:1.

Otrzymane w niniejszej pracy nośniki liposomowe flawonoidów oraz ekstraktów roślinnych, szczególnie w przypadku pęcherzyków lipidowych uformowanych z DPPC, ze względu na wysoką wydajność zamykania aktywnych substancji, sugerują możliwość zastosowania ich np. w przemyśle farmaceutycznym jako suplementy diety czy w przemyśle spożywczym jako dodatki do żywności chroniące ją przed obniżeniem ich właściwości organoleptycznych, w wyniku procesów peroksydacji. Zaletą stworzenia nośników liposomowych katechin jest zwiększenie ich biodostępności, ponieważ katechiny podane doustnie wykazują tylko 2-5% biodostępność [Fang i wsp. 2006]. Kolejną zaletą liposomowych form jest ich wyższa efektywność w ochronie przeciwutleniającej składników błon w porównaniu z bezpośrednim działaniem przeciwutleniaczy, co wykazano w pracy Muszyńska i wsp. [2009]. W pracy tej stwierdzono wyższą skuteczność przeciwutleniającą, zarówno ekstraktów polifenolowych, jak i flawonoidów aplikowanych do mięsa w postaci emulsji, jak i liposomów. Wskazuje to na wyższą dostępność aktywnych składników ekstraktu do tkanek mięsnych z liposomów w porównaniu z aplikacją ekstraktów w formie proszków. Wysoka aktywność formułacji liposomowej wynikała najprawdopodobniej z możliwości wiązania (rozpuszczania się) składników ekstraktów lub flawonoidów z dwuwarstwą liposomów lub miceli emulsji, a następnie łatwego mieszania się z lipidami tkanek mięsa. Podobny wniosek przedstawiono w pracy Barclay i wsp. [1997], gdzie badając skuteczność wybranych przeciwutleniaczy fenolowych z grupy hydroksychromanowych (w tym α -tokoferolu) zamykano je w liposomach formowanych z lipidu o nasyconych łańcuchach, a następnie w takiej postaci dodawano do układu. Autorzy stwierdzili, że efektywność przeciwutleniająca tych przeciwutleniaczy dostarczanych w formie liposomów była dużo wyższa, aniżeli

aplikowanych bezpośrednio z roztworu. Jest także prawdopodobne, że to obecność lecytyny (zarówno w emulsjach, jak i liposomach) wzmacnia proces inhibicji autooksydacji lipidów przez badane antyoksydanty, z uwagi na znane jej właściwości przeciwutleniające [Sikorski 2009].

Za podjęciem tematu badań niniejszej rozprawy przemawiał fakt, że skutecznym i prostym sposobem przedłużania trwałości produktów żywnościowych podlegających autooksydacji jest stosowanie przeciwutleniaczy. Bardzo intensywnie prowadzone są badania nad poszukiwaniem skutecznych naturalnych przeciwutleniaczy zarówno w formie ekstraktów polifenolowych, jak i wysoko oczyszczonych ich komponentów np. flawonoidów. Dotyczy to określania aktywności tych substancji m. in. w warunkach *in vitro* w stosunku do błon modelowych [Gabrielska i wsp. 1997, Gabrielska i Oszmiański 2005, Gabrielska i wsp. 2007, Chaudhuri i wsp. 2007, Bonarska-Kujawa i wsp. i 2008], emulsji i olejów [Frankel i wsp. 1996], a także wzorcowych stabilnych wolnych rodników DPPH[•] oraz ABTS^{•+} [Bąkowska i wsp. 2008]. Stosunkowo niewiele jest informacji w literaturze na temat zastosowania polifenoli do żywności pochodzenia zwierzęcego. Prace w tym zakresie dotyczą głównie zastosowania roślin przyprawowych (rozmarynu, oregano, szalwii) w technologii mięsa [Botsoglou i wsp. 2002; Waszkowiak i Dolata 2007]. Nie ma jak do tej pory badań nad sposobem aplikacji przeciwutleniaczy, zwiększających ich skuteczność w szczególności do świeżej żywności zawierającej tłuszcze np. do mięsa.

7 WNIOSKI

- 1) Wykazano zróżnicowaną aktywność przeciwutleniającą badanych ekstraktów roślinnych oraz flawonoidów, w stosunku do błon liposomów EYPC, zależną od sposobu utleniania błon. Może to sugerować różnorodne mechanizmy ochronnego działania tych przeciwutleniaczy. Osiągnięto główny cel niniejszej pracy - wyłoniono najlepsze przeciwutleniacze spośród stosowanych ekstraktów, okazały się nimi: ekstrakty z zielonej herbaty oraz arniki a także flawonoidy: komponenty arniki - kwercetyna i kwercetyno-3-galaktozyd oraz zielonej herbaty – EGCG. Wyniki te sugerują między innymi odpowiedzialność tych komponentów za wysoką aktywność przeciwutleniającą ekstraktów z arniki oraz zielonej herbaty.
- 2) Wyniki badań przy użyciu wolnego rodnika DPPH[•] wykazały, że wszystkie ekstrakty oraz flawonoidy posiadają zdolność do wychwytywania tego rodnika. Sądzi się na tej podstawie, że jednym z mechanizmów ochronnego działania tych przeciwutleniaczy jest zdolność do zmiatania wolnych rodników atakujących błonę.
- 3) W badaniach metodą FRAP wykazano, że najsilniejszą zdolność do redukowania jonów żelaza ma ekstrakt zielonej herbaty, a najsłabszą ekstrakt mahonii przy jednoczesnym braku możliwości kompleksowania jonów żelaza. Wskazuje to na zdolność komponentów ekstraktu z zielonej herbaty do utleniania się na drodze oddawania elektronu.
- 4) Wykazano na podstawie badań stałej dysocjacji w układzie liposomy EYPC:bufor oraz współczynnika podziału pomiędzy oktanol i wodę, że właściwości przeciwutleniające ekstraktów z zielonej herbaty oraz arniki związane są z ich wysokim powinowactwem do błon liposomów, które skutecznie ochraniają.
- 5) Wykazano, że właściwości przeciwutleniające ekstraktów są skorelowane z zawartością ogółem polifenoli, w tym flawonoidów oraz antocyjanów oraz z ich powinowactwem do błony liposomów. Na tej podstawie osiągnięto zamierzony w niniejszej pracy główny cel badań i sugeruje się, że mechanizm przeciwutleniającego działania badanych ekstraktów w stosunku do błon liposomów EYPC jest efektem synergistycznego dziania wielu czynników w tym

między innymi zawartością w nich aktywnych oraz powinowactwa tych substancji do błon lipidowych.

- 6) Na podstawie badań parametrów fizycznych liposomów jednowarstwowych z zastosowaniem hydrofilowego markera (formowanych metodą sonifikowania oraz kalibrowania przez flirty poliwęglanowe) wykazano, że wraz ze wzrostem liczby atomów węgla w łańcuchach acylowych lipidów, z których formowano pęcherzyki jednowarstwowe, zmniejsza się użyteczność liposomów do efektywnego zamykania w nich substancji hydrofilowych, natomiast wzrost liczby wiązań podwójnych w dwuwarstwie lipidów sprzyjał efektywności zamykania w nich takich substancji
- 7) W wyniku analizy rozmiarów średnic, z zastosowaniem Zeta-Sizera, liposomów w zależności od zastosowanego do ich sformowania lipidu oraz metody formowania pęcherzyków lipidowych stwierdzono, że wzrost liczby atomów węgla w cząsteczce lipidów wpływa na wzrost średnic formowanych liposomów, natomiast wzrost liczby wiązań podwójnych w łańcuchach acylowych lipidów z których formowano pęcherzyki jednowarstwowe powodował powstawanie mniejszych liposomów. Liposomy przeciskane miały większe rozmiary w porównaniu z pęcherzykami lipidowymi sonifikowanymi. Liposomy FAT były najmniejsze w porównaniu z pęcherzykami lipidowymi otrzymanymi innymi metodami.
- 8) Zrealizowano poboczny cel badań - określanie efektywności zamykania przeciwutleniaczy wyłonionych w pierwszym etapie badań jako najefektywniejsze w liposomach formowanych z różnych fosfolipidów z dodatkiem cholesterolu i bez niego. Wykazano wyższy procent zamykania flawonoidów, jako przeciwutleniaczy, aniżeli ekstraktów polifenolowych. W przypadku flawonoidów wydajność zamykania wahała się od 54 % dla kwercetyny i 56 % dla epikatechiny do 76 % w przypadku EGCG, natomiast gdy zamykano ekstrakty polifenolowe najwyższą efektywność zamykania otrzymano dla zielonej herbaty (33,29 %) oraz arniki (31,49 %). Do otrzymania w/w nośników zastosowano nowatorską metodę poddania liposomów FAT sonifikowaniu (FAT-s)
- 9) Badania z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej TMA-DPH wykazały, że badane ekstrakty roślinne oraz flawonoidy w niewielkim stopniu wpływały na

mikrootoczenie tej sondy, więc na płynność błon liposomów DPPC. Największy wzrost anizotropii fluorescencji sondy spowodowały ekstrakty z arniki (26,3 %) oraz zielonej herbaty (9,9 %), a także związek EGCG (15,8 %) - sugerując modyfikację błony polegającą na jej usztywnieniu. Taka modyfikacja błony sprzyjała jej ochronie przed działaniem wolnych rodników przez wyżej wymienione substancje będące dobrymi przeciwutleniaczami.

- 10) Sugeruje się potencjalne możliwości zastosowania otrzymanych nośników liposomowych przeciwutleniaczy w przemyśle spożywczym, kosmetycznym oraz farmaceutycznym. W przemyśle spożywczym proponuje się ich wykorzystanie w celu ochrony produktów zawierających tłuszcze przed zachodzącymi procesami jęłczenia pogarszającymi właściwości organoleptyczne produktów. Inną możliwością zastosowania są suplementy diety czy dodatki funkcjonalne do żywności przeznaczone dla np. ludzi starszych i osłabionych.
- 11) Wyniki badan *in vitro* z użyciem modelowych błon fosfolipidowych sugerują możliwe ochronne działanie zastosowanych naturalnych polifenoli wobec peroksydacji błon komórkowych zarówno organizmów żywych, jak i lipidów mięśni przeznaczonych do konsumpcji.

8 LITERATURA

Aaby K., Hvattum E., Skrede G. (2004), Analysis of Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using High-Performance Liquid Chromatography with Coulometric Array Detection: Relationship to Antioxidant Activity. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry* 52, 4595-4603.

Ahmed S., Rahman A., Hasnain A., Lalonde M., Goldberg V.M., Haqqi T.M. (2002), Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1-induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radical and Biology* 33(8), 1097-1105.

Ahmed S. (2010), Green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate in arthritis: progress and promise. *Ahmed Arthritis Research & Therapy* 12, 208.

Allen T.M., Cleland L.G. (1980), Serum-induced leakage of liposome contents. *Biochimica et Biophysica Acta* 597, 418-416.

Allen T.M., Cullis P.R. (2004), Drug delivery systems: Entering the Mainstream. *Science* 303, 1818-1822.

Arct J., Pytkowska K. (2008), Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. *Clinics in Dermatology* 26, 347-357.

Areias F.M., Rego A.C., Oliveira C.R., Seabra R.M. (2001), Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe²⁺ - induced oxidative stress in cultured retinal cells. *Biochemical Pharmacology* 62, 111-118.

Arora A., Nair M.G., Strasburg G.M. (1998), Structure-activity relationships for antioxidant activities of series of flavonoids in liposomal systems. *Free Radical Biology and Medicine* 24(9), 1355-1363.

Arora A., Byrem T.M., Nair M.G., Strasburg G.M. (2000), Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373(1), 102-109.

Arora A., Raghuraman H., Chattopadhyay A. (2004), Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics: a fluorescence approach. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318, 920-926.

Aruoma O.I., Halliwell B., Laughton M.J., Quinlan G.J., Gutteridge J.M. (1989), The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochemical Journal* 258, 617-620.

Bagatolli L.A., Parasassi T., Gratton E. (2000), Giant phospholipids vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods. A two photon fluorescence microscopy study. *Chemistry and Physics of Lipids*. 105(2), 135-47.

Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C. (1965), Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipides, *Journal of Molecular Biology* 13, 238-252.

Barclay L.R.C., Antunes F., Egawa J., McAllister K.L., Mukai K., Nishi T., Vinqvist M.R. (1997), The efficiency of antioxidants delivered by liposomal transfer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1328, 1-12.

- Bartosiewicz D., Kozubek A. (2008), Liposomy w dermatologii i kosmetyce. Lek w praktyce 18(708), 85-92.
- Bartosz G. (2006), Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. ISBN-13: 978-83-01-13847-9, ISBN-10: 83-01-13847-5
- Bąkowska-Barczak A., Kołodziejczyk P. (2008), Evaluation of saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) cultivars for their polyphenol content, antioxidant properties and storage stability. Journal of the Agricultural and Food Chemistry 56, 9933-9940.
- Behera T., Swain P., Sahoo S.K. (2011), Antigen in chitosan coated liposomes enhances immune responses through parenteral immunization. International Immunopharmacology 11, 907-914.
- Benvenuti S., Pellati F., Melegari M., Beertelli D. (2004), Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of Rubus, Ribes and Aronia. Journal of Food Science 69, 164-169.
- Buege J.A., Aust S.D. (1978), Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology 52, 302-310.
- Benzie I.F.F., Strain J.J. (1996), Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. Analytical Biochemistry 239, 70-76.
- Bernhardt I., Ellory J.C. (2003), Red Cell Membrane Transport in Health and Disease. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.
- Betz G., Aeppli A., Menshutina N., Leuenberger H. (2005), In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application International Journal of Pharmaceutics 296, 44-54.
- Bhattacharya S., Bajaj A. (2008), Fluorescence and thermotropic studies of the interactions of PEI-cholesterol based PEI-chol lipopolymers with dipalmitoyl phosphatidylcholine membranes. Biochimica et Biophysica Acta 1778, 2225-2233.
- Bonarska-Kujawa D., Włoch A., Kleszczyńska H., Oszmiański J. (2008), Właściwości przeciwutleniające polifenolowych ekstraktów owocowych. Błony biologiczne, red. J.Gabrielska i P. Misiak, ISBN 978-83-9267758-0-8, Wrocław 2008, 137-142.
- Boots A.W., Haenen G.R.M.M., Bast A. (2008), Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. European Journal of Pharmacology 585, 325-337.
- Bors W., Michel C., Stettmaier K. (2000), Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. Archives of Biochemistry and Biophysics 374, 347-355.
- Botsoglou N.A., Christaki E., Fletouris D.J., Florou-Paneri P., Spais A.B. (2002), The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. Meat Sciences 62, 259-265.
- Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H., Marzouk B. (2008), Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L., shoots and roots. Comptes Rendus Biologies 331, 48-55.
- Brand-Williams B., Cuvelier M.E., Berset C. (1995), Use of free radical method to evaluate 445 antioxidant activities. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 28(1), 25-30.

- Carafa M., Santucci E., Alhaique F., Coviello T., Murtas E., Ricciari F.M., Lucania G., Torrisi M.R. (1998), Preparation and properties of new unilamellar non-ionic/ionic surfactant vesicles. *International Journal of Pharmaceutics* 160, 51-59.
- Caturla N., Vera-Samper E., Villalain J., Mateo R., Micol V. (2003), The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipids model membranes. *Free Radical Biology & Medicine* 34(6), 648-662.
- Cevc G., Gebauer D., Stieber J., Schätzlein A., Blume G. (1998), Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1368, 201-215.
- Chaudhuri S., Banerjee A., Basu K, Sengupta B., Sengupta P. (2007), Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules* 41, 42-48.
- Chaudhry Q, Castle L. (2011), Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. *Trends in Food Science & Technology* 22, 595-603.
- Cheng T.O.(2006), All teas are not created equal The Chinese green tea and cardiovascular health. *International Journal of Cardiology* 108, 301-308.
- Chvátalová K. Slaninová I. Březinová L., Slanina J. (2008), Influence of dietary phenolic acids on redox status of iron: Ferrous iron autoxidation and ferric iron reduction. *Food Chemistry* 106, 650-660.
- Coimbra M., Isacchi B., van Bloois L., Torano J.S., Ket A., Wu X., Broere F., Metselaar J.M., Rijcken C.J.F., Storm G., Bilia R., Schiffelers R.M. (2011), Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 416, 433-442.
- Сорокопуоое В.Н., Хлеонукое В.А., Дейека В.И. (2005). АНТОЦИАНЫ НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *BERBERIDACEAE*. *Химия растительного сырья*. 4, 57-60.
- Corm P.F., Schlach W., Truscott T.G. (1991), The singlet oxygen and carotenoid interactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 11, 41-47.
- Cornard J.P., Boudet A.S., Merlin J.C. (2001), Complexes of Al(III) with 3'4'-dihydroxy-flavone: characterization, theoretical and spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A* 57, 591-602.
- Cosco D., Paolino D., Maiuolo J., Russo D., Fresta M. (2011), Liposomes as multicompartimental carriers for the multidrug delivery in anticancer chemotherapy. *Drug Delivery and Translational Research* 1, 66-75.
- Cosco D., Paolino D., Cilurzo F., Casalea F., Frestaa M.(2012), Gemcitabine and tamoxifen-loaded liposomes as multidrug carriers for the treatment of breast cancer diseases. *International Journal of Pharmaceutics* 422, 229-237.
- Czapecka E., Mareczek A., Leja M. (2005), Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. *Food Chemistry* 93, 223-226.

- De Clercq E. (2000), Current lead natural products for the chemotherapy of *Streptomyces griseus* catechol O-methyltransferase. Applied and Environmental Microbiology 66, 4877-4882.
- De Gier J., Mandersloot J.G., Van Deenen L.L.M. (1968), Lipid composition and permeability of liposomes. Biochimica et Biophysica Acta 150, 666-675.
- Degim Z., Ünal N., Eşsiz D., Abbasoglu (2004), The effect of various liposome formulations on insulin penetration across Caco-2 cell monolayer. Life Sciences 75, 2819-2827.
- Demir F. Kalyoncu I.H. (2003), Some nutritional, pomological and physical properties of cornelian cherry (*Cornus mas* L.). Journal of Food Engineering 60, 335-341.
- Devaux P.F. (1991), Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. Biochemistry 30(5), 1163-1173.
- Devika P.T., Stnaley P. (2007), Protective effect of (-)-epigallocatechin-gallate (EGCG) on lipid peroxide metabolism in isoproterenol induced myocardial infarction in male Wistar rats: A histopathological study. Biomedicine & Pharmacotherapy 62(10) 701-701.
- Djeridane A., Yousfi M. Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006), Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry 97, 654-660.
- Dołowy K., Szewczyk A., Piśula S. (2003), Błony biologiczne. Wydawnictwo Naukowe „Śląsk”, Katowice. ISBN 83-7164-295-4.
- Drulis-Kawa Z., Dorotkiewicz-Jach A. (2010), Liposomes as delivery systems for antibiotics. International Journal of Pharmaceutics 387, 187-198.
- Dumas D., Muller S., Gouin F., Baros F., Viriot M-L., Stoltz J.F. (1997), Membrane fluidity and oxygen diffusion in cholesterol-enriched erythrocyte membrane. Archives of Biochemistry and Biophysics 341, 34-39.
- Duthie G.G., Gardner P.T., Kyle J.A.M. (2003), Plant polyphenols: are they the new magic bulle?. Proceedings of the Nutrition 62, 599–603.
- El-Samaligy M.S., Afifi N.N., Mahmoud E.A. (2006), Evaluation of hybrid liposomes-encapsulated silymarin regarding physical stability and in vivo performance. International Journal of Pharmaceutics 319, 121-129.
- Elsayed M.M.A, Abdallah O.Y., Nagar V.F., Khalafallah N.M. (2007), Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. International Journal of Pharmaceutics 332, 1-16.
- Engelke M., Bojarski P., Bloß R., Diehl H. (2001), Tamoxifen perturbs lipid bilayer order and permeability: comparison of DSC, fluorescence anisotropy, Laurdan generalized polarization and carboxyfluorescein leakage studies. Biophysical Chemistry 90, 157-173.
- Erleijman A.G., Verstraeten S.V., Fraga C.G., Oteiza P.I. (2004), The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. Free Radical Research 38(12), 1311-1320.
- Fan M., Xu S., Xia S., Zhang X. (2007), Effect of Different Preparation Methods on Physicochemical Properties of Salidroside Liposomes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 3089-3095.

- Fang J.-Y., Hwang T.-L., Huang Y.-L. Huang, Fang Ch.-L. (2006), Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol. *International Journal of Pharmaceutics* 310, 131–138.
- Fang Z., Bhandari B. (2010), Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology* 21, 510-523.
- Fatehi M., Saleh T.M., Fatehi-Hassanabad Z., Farrokhfal K., Jafarzadeh M., Davodi S. (2005), A pharmacological study on *Berberis vulgaris* fruit extract. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 46-52,
- Felber A.E., Dufresne M., Leroux J. (2011), pH-sensitive vesicles, polymeric micelles, and nanospheres prepared with polycarboxylates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, doi:10.1016/j.addr.2011.09.006.
- Ferguson L.R. (2001), Role of polyphenols in genomic stability. *Mutation Research* 475, 89-111.
- Foti M., Piattelli M., Baratta T. M., Ruberto G. (1996), Flavonoids, coumarins and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure–Activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 497-501.
- Frankel E.N., Huang S.-W., Prior E., Aeschbach R. (1996), Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72, 201-208.
- Frauen M., Rode T., Rapp C., Steinhart H. (2002), Determination of green-tea catechins in cosmetic formulation and in-vitro skin extracts by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Chromatographia* 55, 43-48.
- Gaber M.H., Wu N.Z., Hong K., Huang S., K., Dewhirst M.W., Papahadjopoulos D. (1996), Thermosensitive liposomes: extravasation and release of contents in tumor microvascular networks, *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 36(5), 1177-1187.
- Gabrielska J., Oszmiański J., Żyłka R., Komorowska M. (1997), Antioxidant activity of flavones from *Scutellaria baicalensis* in lecithin liposomes. *Zeitschrift für Naturforschung* 52, 817-823.
- Gabrielska J. (2001). Karotenoidy, flawonoidy i związki metaloorganiczne - wpływ na utleniania i strukturę błon fosfolipidowych *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu* nr 408, Rozprawy CLXXIX, Wydaw. AR, ISSN 0867-7964.
- Gabrielska J., Oszmiański J. (2005), Antioxidant activity of anthocyanin glycoside derivatives evaluated by the inhibition of liposome oxidation. *Zeitschrift für Naturforschung* 60c, 399-407.
- Gabrielska J., Soczyńska-Kordala M., Gładyszowski J., Żyłka R., Miśkiewicz J., Przestalski S. (2006), Antioxidative effect of Quercetin and its equimolar mixtures with phenyltin compounds on liposomy membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7735-7745.
- Gabrielska J., Korzeniowska M., Wojdyło A. (2007), Antioxidative effect of plant extracts and flavones on liposome and erythrocyte membranes, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 57(4), 145-150.

- Gao, X., Ohlander, M., Jeppson, N., Bjork, L., Trajkovski, V.(2000), Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(5), 1485-1490.
- Garrett R.H., Grisham Ch.M. (1999), *Biochemistry* (2nd edition) Harcourt Brace, Custom Publishers, ISBN 0030758173.
- Gautam R., Saklani A., Jachak S.M. (2007), Indian medicinal plants as source of antioxidants. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 200-234.
- Gerber M.A., Randolph M.F., DeMeo K.K. (1990), Liposome immunoassay for rapid identification of group A streptococci directly from throat swabs. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 1463-1464.
- Ghosh A.K., Pore N., Basu R., De S., Nandy P. (1996), Lipid perturbation by corticosteroids: an anisotropic study. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 7, 65-68.
- Gibbs B.F., Kermasha S., Alli I., Mulligan C.N. (1999), Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 50(3), 213-224.
- Gilani A.H., Bashir S., Khan A. (2007), Pharmacological basic for the use of *Borago officinalis* in gastrointestinal, respiratory and cardiovascular disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 114, 393-399.
- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. (2001), Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad RE, Acree TE, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Sporns P, editors. *Current protocols in food analytical chemistry*. 1st ed. New York: JohnWiley & Sons, Inc. p F1.2.1–F.2.13.
- Goldberg R., Klein J. (2012), Liposomes as lubricants: beyond drug delivery. *Chemistry and Physics of Lipids*. doi:10.1016/j.chemphyslip.2011.11.007
- Gonnet, M., Lethuaut, L., Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*. 146(3), 276-90.
- Gordon M.H., Paiva-Martins F., Almeida M. (2001), Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(5), 2480-2485.
- Grajek W. (Redaktor) (2007), *Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa. ISBN 978-83-204-3277-0.
- Guo M., Perez C., Wie Y., Rapoza E., Su G., Bou-Abdallah F., Chasteen N.D. (2007), Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton Transactions* 43, 4951-4961.
- Haberland A., Damerau W., Stüsser R., Schmke I., Baumann G. (1996), Fe²⁺/Vitamin C – An Appropriate In Vitro model system to initiate lipid peroxidation. *Journal of Inorganic Biochemistry* 61, 43-53.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2007), *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th. Edition, Oxford University Press ed. ISBN: 019856869X ISBN-13: 9780198568698.
- Hames B.D., Hooper N.M. (2002), *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, ISBN 83-01-13872-6.

- Harman D. (1956). Aging: a theory based no free radical and radiation chemistry. The Journals of Gerontology 11, 298-300.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002), Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry 13, 572-584.
- Hendrich A.B. (2006), Flavonoid-mambrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolics compounds. Acta Pharmacologica Sinica 27(1), 27-40.
- Henning S.M., Niu Y., Liu Y., Lee N.H., Hara Y., Thames .G.D., Minutki R.R., Carpenter C.L., Wang H., Heber D. (2005), Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals. Journal of Nutritional Biochemistry 16, 610-616.
- Heo H.J., Kim Y.J., Chung D., Kim D.-O. (2007), Antioxidant capacities of individual and combined phenolics In a model systems. Food Chemistry 104, 87-92.
- Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F., Munné-Bosch S. (2009), How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? Trends in Plant Science 14(3), 125-132.
- Hlava B., Starý F., Pospíšil F. (1984), Rośliny kosmetyczne. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa. ISBN 83-09-00765-5.
- Hochstein P., Nordenbrand K., Ernster L. (1964), Evidence for the involvement of iron in the ADP-activated peroxidation of lipid in microsomes and mitochondria. Biochemical and Biophysical Research Communications 14, 323-328.
- Hofmann M., Schumann C., Zimmer G., Henzel K, Locher U., Leuschner U. (2000), LUV's lipid composition modulates diffusion of bile acids. Chemistry and Physics of Lipids 110, 165-171.
- Honeywell-Nguyen P.L., Bouwstra J.A. (2005), Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. Drug Discovery Today: Technologies 2(1), 67-74.
- Hou Z., Lambert J.D., Chin K.-V, Yang Ch. S. (2004). Effects of tea polyphenols on signal transduction pathways related to cancer chemoprevention. Mutation Research 555, 3-19.
- Hu Ch., Kitts D.D.(2001), Evaluation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate in biphasic model systems in vitro. Molecular and Cellular Biochemistry 218, 147-155.
- Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005), The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 1841-1856.
- Hwang T.-L, Lee W.-R., Hua S.-Ch, Fang J.-Y. (2007), Cisplatin encapsulated in phosphatidylethanolamine liposomes enhances the in vitro cytotoxicity and in vivo intratumor drug accumulation against melanomas. Journal of Dermatological Science 46, 11-20.
- Iauk L., Costanzo R., Caccamo F., Rapisarda A., Musumeci R., Milazzo I., Blandino G. (2007), Activity od *Berberis aetnensis* root extracts on Candidia strains. Fitoterapia 78, 159-161.
- Iftime A., Popescu A., Ganea C. (2010), Effects of epigallocatechin gallate on artificial lipid membranes. Romanian Journal of Biophysics 20(4), 323-334.

- Ikeda M., Kihara A., Igarashi Y. (2006), Lipid Asymmetry of the Eukaryotic Plasma Membrane: Functions and Related Enzymes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29(8), 1542-1546.
- Inoue K. (1974), Permeability properties of liposomes prepared from dipalmitoyllecithin, dimyristoyllecithin, egg lecithin, rat liver lecithin and beef brain sphingomyelin. *Biochimica et Biophysica Acta* 339, 390-402.
- Israelachvili J.N. (1992), Intermolecular and surface forces. Academy Press, Harcourt Brace & Company, Publishers, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 395-421.
- Ivanovska N., Philipov S. (1996), Study on the anti-inflammatory action of *Berberis vulgaris* root extract, alkaloid fractions and pure alkaloids. *International Journal of Immunopharmacology* 18(10), 553-561.
- Jabłońska-Ryś E., Zalewska-Korona M., Kalbarczyk J. (2009), Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics contents in wild edible fruits. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 17(2), 115-120.
- Janbaz K.H., Gilani A.H. (2000), Studies on preventive and curative effects of berberine on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia* 71(1), 25-33.
- Janmey P.A., Kinnunen P.K.J. (2006), Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends in Cell Biology* 16(10), 538-546.
- Jayaprakasam B., Vareed S.K., Olson L.K., Nair M.G. (2005), Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins presents in fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 28-31.
- Jędrzejko K., Kowalczyk B., Balcer B. (2006), Rośliny kosmetyczne. Śląska Akademia Medyczna, Katowice. ISBN 83-88895-89-3.
- Jukanti R., Devaraj G., Devaraj R., Apte S. (2011), Drug targeting to inflammation: Studies on antioxidant surface loaded diclofenac liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 414, 179-185.
- Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. (1999), Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3954-3962.
- Kajiya K., Kumazawa S., Nakayama T. (2002), Effects of external factors on the interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66(11), 2330-2335.
- Karawita R., Siriwardhana N., Lee K.-W., Heo M.-S., Yeo I.-K., Lee Y.-D., Jeon Y.-J. (2005), Reactive oxygen species scavenging, metal chelation, reducing power and lipid oxidation inhibition properties of different solvent fractions from *Hizikia fusiformis*. *Eur Food Res. Technol.* 220, 363-371.
- Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M. (2006), Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94, 550-557.
- Keller B.C. (2001), Liposomes in nutrition. *Trends in Food Science & Technology* 12, 25-31.
- Kheadr E.E., Vuilleumard J.C., El-Deeb S.A. (2003), Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. *Food Research International* 36, 241-252.

- Kheirrolomoom A., Kruse D.E., Qin S., Watson K.E., Lai C.-Y., Young L.J.T., Cardiff R.D., Ferrara K.W. (2009), Enhanced in vivo bioluminescence imaging using liposomal luciferin delivery system, *Journal of. Controlled. Release* 141, 128-130.
- Kong J.-M., Chia L.-S., Goh N.-K., Chia T.-F., Brouillard R. (2003), Analysis and biological activities of anthocyanins. *Photochemistry* 64, 923-933.
- Kono K. (2001), Thermosensitive polymer-modified liposomes. *Advances Drug Delivery Reviews* 53, 307-319.
- Korade Z., Kenworthy A.K. (2008), Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology* 55, 1265–1273.
- Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Strigunova E.N., Kostyuk T.V., Afanas'ev I.B. (2004), Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 428, 204-208.
- Košťalova D., Kardošová A., Hajnická V. (2001), Effect of *Mahonia aquifolium* stem bark crude extract and one of its polysaccharide components on production of IL-8. *Fitoterapia* 72, 802-806.
- Kozubek A., Sikorski A., Szopa J. (1996), Molekularna organizacja komórki - część 2 Lipidy, liposomy i błony biologiczne. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław, ISBN 83-229-1513-6.
- Kozubek A., Gubernator J., Przeworska E., Stasiuk M. (2000), Liposomal drug delivery, a novel approach: PLARosomes. *Acta Biochimica Polonica* 47(3), 639-649.
- Kozubek A. (2004), Wstęp do technologii liposomowej. Wrocław 2004.
- Kristl J., Teskač K., Caddeo C., Abramovic Z., Šentjurc M. (2009), Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 73, 253–259.
- Kumar S., Müller K. (1999), Medicinal plants from Nepal; II. Evaluation as inhibitors of lipid peroxidation in biological membranes. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 135-139.
- Kuo S. –M. (2002), Flavonoids and gene expression in mammalian cells. *Flavonoids in Cell Function*, edited by Bela Busing and John Manthey, 191-200.
- Küpeli E., Koşar M., Yeşlada E., Hüsnü K., Başer C. (2002), A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* species. *Life Sciences* 72, 645-657.
- Lakowicz J.R. (1999), Principles of fluorescence spectroscopy. 2nd edition 1999, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, London. Springer. ISBN: 0306460939.
- Laporta O., Pérez-Fons L., Mallavia R., Caturla N., Micol V. (2007), Isolation, characterization and antioxidant capacity assessment of the bioactive compounds derived from *Hypoxis rooperi* corm extract (African potato). *Food Chemistry* 101, 1425-1437.
- Laridi R., Kheadr E.E., Benech R.-O., Vuilleumard J.C., Lacroix C., Fliss, I. (2003), Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal* 13, 325-336.

- Lasic D.D. (1995), Applications of liposomes. In: Lipowski R, Sackmann E (eds) Structure and dynamics of membranes. From cells to vesicles. Elsevier, Holland.
- Lasic D.D. (1998), Novel applications of liposomes. Trends in Biotechnology 16(7), 307-321.
- Lasic (1952-2000): Pioneer in the development of liposomes in medicine. Current Opinion in Colloid & Interface Science (2001) 6, 91-92.
- Lee J.-S., Chung D., Lee H.G. (2008), Preparation and characterization of calcium pectinate gel beads entrapping catechin-loaded liposomes. International Journal of Biological Macromolecules 42, 178–184.
- Lee W.-Ch., Tsai T.H. (2010), Preparation and characterization of liposomal coenzyme Q10 for in vivo topical application. International Journal of Pharmaceutics 395, 78-83.
- Lemańska K., Szymusiak H., Tyrakowska B., Zieliński R., Soffers A.E.M.F., Rietjens I.M.C.M. (2001), The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. Free Radical Biology and Medicine 31(7), 869-881. (raz cytowane)
- Leonhardt W., Bergmann R., Hanefeld M. (1997), Initiation of LDL oxidation by copper ions or AAPH yields different kinetic parameters which are correlated. Clinica Chimica Acta 18 259(1-2), 195-197.
- Lindner L.H., Hossann M., Vogeser M., Teichert N., Wachholz K., Eibl H., Hiddemann W., Issels R.D. (2008), Dual role of hexadecylphosphocholine (mitofosine) in thermosensitive liposomes: Active ingredient and mediator of drug release. Journal of Controlled Release 125, 112-120.
- Lopes G.K.B., Schulman H.M., Hemes-Lima M. (1999), Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects 1472, 142-152.
- Luo Y., Cai Q., Sun M., Corke H. (2004), Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medical plants associated with anticancer. Life Sciences 74, 2157-2184.
- Łukaszewicz M., Matysiak-Kata I., Aksamit A., Oszmiański J., Szopa J. (2002), 14-3-3 Protein regulation of the antioxidant capacity of transgenic potato tubers. Plant Science 163, 125-130.
- Madsen H.L., Sorensen B., Skibsted L.H., Bertelsen G. (1998), The Antioxidative activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in drying stored exposed to light or in darkness. Food Chemistry 63(2), 173-180.
- Mady M.M., Elshemey W.M. (2011), Interaction of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) liposomes and insulin. Molecular Physics 109(12), 1593-1598.
- Malavia N.K., Zurakowski D., Schroeder A., Princiotto A.P., Laury A.R., Barash H.E., Sodroski J., Langer R., Madani N., Kohane D.S. (2011), Liposomes for HIV prophylaxis. Biomaterials 32, 8663-8668
- Malheiros P.S., Daroit D.J., Brandelli A. (2010a), Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. Trends in Food Science & Technology 21, 284-292.

- Malheiros P.S., Daroit D.J., Silveira N.P., Brandelli A. (2010b), Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiology* 27, 175-178.
- Małolepsza U., Urbanek H. (2000), Flawonoidy roślinne jako związki biochemicznie czynne. *Wiadomości Botaniczne* 44(3/4), 27-37.
- Manconi M., Sinico Ch., Caddeo C., Vila C.O., Valenti D., Fadda A.M. (2011), Penetration enhancer containing vesicles as carriers for dermal delivery of tretinoin. *International Journal of Pharmaceutics* 412, 37-46.
- Mannock D.A., Lewis R.N.A.H., McMullen T.P.W., McElhaney R.N. (2010), The effect of variations in phospholipid and sterol structure on the nature of lipid-sterol interactions in lipid bilayer model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 163, 403-448.
- Marinova D., Ribarova F., Atanassova M. (2005), Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 40(3), 255-260.
- Marsanasco M., Márquez A.L., Wagner J.R., Chiaramoni N. (2011), Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Research International* 44, 3039-3046.
- Massing U., Fuxius S. (2000), Liposomal formulations of anticancer drugs: selectivity and effectiveness. *Drug Resistance Updates* 3, 171-177.
- Mastrobattista E., Koning G.A., Storm G. (1999), Immunoliposomes for targeted delivery of antitumor drugs. *Adv. Drug Delivery Review* 40, 103-127.
- McCune L.M., Johns T. (2002), Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest *Journal of Ethnopharmacology* 82, 197-205.
- Merken H.M., Beecher G.R. (2000), Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal of Chromatography A* 897, 177-184.
- Middleton E.J., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000), The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52, 673-751.
- Mignet N., Seguin J., Romano M.R., Brullé L., Touil Y.S., Scherman D., Bessodes M., Chabot G.G. (2012), Development of a liposomal formulation of the natural flavonoid fisetin. *International Journal of Pharmaceutics* 423, 69- 76.
- Minotti G., Aust S.D. (1987), The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry* 262(3), issue of January 25, 1098-1104.
- Mizoguchi H., Hara S. (1996), Effect of Fatty Acid Saturation in Membrane Lipid Bilayers on Simple Diffusion in the Presence of Ethanol at High Concentrations. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81(5), 406-411.
- Moribe K., Maruyama K., Iwatsuru M. (1999), Molecular localization and state of amphotericin B in PEG liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 193, 97-106.

- Motalleb G., Hanachi P., Kua S.H., Fauziah O., Asmah R. (2005), Evaluation of phenolic content and total antioxidant activity in *Berberis vulgaris* fruit extract. *Journal of Biological Sciences* 5(5), 648-653.
- Moussaoui N., Cansell M., Denizot A. (2002), Marinosomes®, marine lipid-based liposomes: physical characterization and potential application in cosmetics. *International Journal of Pharmaceutics* 242, 361-365.
- Mozafari M. R. (2005), Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular & Molecular Biology Letters* 10, 711-719.
- Müller R.H., Radtke M., Wissing S.A. (2002), Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 Suppl., 131-155.
- Muszyńska A., Pyrkosz-Biardzka K., Korzeniowska M., Gabrielska J. (2009), Polyphenols in emulsion and liposomes as effective protectors of meat products against oxidation, in: *New concepts in food evaluation Nutraceuticals-Analyses-Consumer*, edited by Tadeusz Trziszka and Maciej Oziembłowski, Wrocław 2009. ISSN 1898-1151, ISBN 978-83-60574-68-3. s.154.
- Nagahama M., Michiue K., Sakurai J. (1996), Membrane-damaging action of *Clostridium perfringens* alpha-toxin on phospholipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1280, 120-126.
- Nair M.P.N., Saiyed Z.N., Gandhi N.H., Ramchand C.N. (2009), The Flavonoid, Quercetin, Inhibits HIV-1 Infection in Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells, *American Journal of Infectious Diseases* 5 (2), 142-148.
- Nenadis N., Zafiropoulou I., Tsimidou M. (2003), Commonly used food antioxidant: a comparative study in dispersed systems. *Food Chemistry* 82(3), 403-407.
- Nicolosi D., Scalia M., Nicolosi V.M., Pignatello R. (2010), Encapsulation in fusogenic liposomes broadens the spectrum of action of vancomycin against Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35, 553-558.
- Nii T., Ishii F. (2005), Encapsulation efficiency of water – soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *International Journal of Pharmaceutics* 298, 198-205.
- Ollila F., Halling K., Vuorela P., Vuorela H., Slotte J.P. (2002), Characterization of flavonoid-biomembrane interaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 399(1), 103-108.
- Ono K., Nakane H., Fukushima M., Hermann J.C., Barre-Sinoussi F. (1990), Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerase. *Eur. J.Biochem.* 190, 469-476.
- Oszmiański J., Wolniak M., Wojdyło A., Wawer I. (2007), Comparative study of polyphenolic content and antiradical activity of cloudy and clear apple juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 573-579.
- Oteiza P., Erlejman A.G., Verstraeten S.V., Keen C.L., Fraga C.G. (2005), Flavonoid membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface. *Clinical and Developmental Immunology* 12 (1), 19-25.
- Paiva-Martins F., Gordon M.H., Gameiro P. (2003), Activity and location of olive oil phenolics antioxidants in liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* 124, 23-36.

- Pantelidis G.E., Vasilakakis M., Manganaris G.A., Diamantidis Gr. (2007), Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry* 102, 777-783.
- Parasassi T., Giusti A.M., Raimondi M., Gratton E. (1995), Abrupt Modifications of Phospholipid Bilayer Properties at Critical Cholesterol Concentrations. *Biophysical Journal* 68, 1895-1902.
- Patra S.K. (2008), Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1785, 182-206.
- Petrovic L., Sovij V., Dokic P., Schäffer I. (2004), Formation of proanthocyanidin-loaded liposomes under various condition. *Progress in Colloid and Polymer Science* 125, 194-197.
- Piard J.C., ElSoda M., Alkhalaf W., Rousseau M., Desmazeaud M., Vassal L. (1986), Acceleration of cheese ripening with liposome entrapped proteinase. *Biotechnology Letters* 8, 241- 246.
- Pietta P.-G. (2000), Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63, 1035-1042.
- Pintea A., Diehl H.A., Momeu C., Aberle L., Socaciu C. (2005), Incorporation of carotenoid esters into liposomes. *Biophysical Chemistry* 118, 7-14.
- Paltauf O.F., Hermetter A., (1994), Strategies for the synthesis of glycerophospholipids *Progress in Lipid Research* 33 (3), 239-328.
- Plecka P. (2010), Nowoczesna diagnostyka i leczenie dokanałowe nowotworowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych w guzach litych u dorosłych. *Onkologia w Praktyce Klinicznej* 6(3), 97-103.
- Polanowski A. (Redaktor), *Laboratorium z biochemii dla studentów biochemii, biotechnologii i ochrony środowiska*, Wydanie drugie poszerzone i poprawione Wydanie Biologica Silesiae Wrocław 2007, ISBN 978-83-921764-2-8.
- Puzanowska-Tarasiewicz H., Starczewska B., Kuźmicka L. (2008), Reaktywne formy tlenu. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* XLI, 4, 1007-1015.
- Rackova, L., Oblozinsky, M., Kostalova, D., Kettmann, V., & Bezakova, L. (2007), Free radical scavenging activity and lipoxygenase inhibition of *Mahonia aquifolium* extract and isoquinoline alkaloids. *Journal of Inflammation*, 4(15), 1-7.
- Rao D. R., Chawan C. B., Veeramachaneni R. (1995), Liposomal encapsulation of beta-galactosidase - comparison of two methods of encapsulation and in vitro lactose digestibility. *Journal of Food Biochemistry* 18, 239-251.
- Ratman D.V., Ankola D.D., Bhardwaj V., Sahana D.K., Ravi Kumar M.N.V. (2006), Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release* 113, 189-207.
- Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. (2003), Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews* 23(4), 519-534.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1997), Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant sciences* 2(4), 152-159.
- Ruozi B., Riva G., Belletti D., Tosi G., Forni F., Mucci A., Barozzi P., Luppi M., Vandelli M.A. (2010), Cidofovir-loaded liposomes: an intro-study using BCBL-1 cell

line as a model for primary effusion lymphoma. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 41, 254-264.

Rutkowski R., Pancewicz S.A., Rutkowski K., Rutkowska J. (2007), Znaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w patomechanizmie procesu zapalnego. *Polski Merkuriusz Lekarski* XXIII. 134,131-136.

Sackmann E. (1995), *Physical Basis of Self-Organization and Function of Membranes: Physics of Vesicles*. [w:] *Nahdbuch of biological physics*. Lipowsky R., Sackmann E. (eds). Elsevier Sciences, Amstredam, New York, Tokyo. Vol.1., 213-304.

Sadzuka Y., Nakade A., Tsuruda T., Sonobe T. (2003), Study on the characterization of mixed polyethyleneglycol modified liposomes containing doxorubicin. *Journal of Controlled Release* 91, 271-280.

Samuni A.M., Lipman A., Barenholz Y. (2000), Damage to liposomal lipids: protection by antioxidants and cholesterol-mediated dehydration. *Chemistry and Physics of Lipids* 105(2), 121-134.

Sandström M.C., Icenstein L.M., Mayer L.D., Edwards K. (2005), Effects of lipid segregation and lysolipid dissociation on drug release from thermosensitive liposomes. *Journal of Controlled Release* 107, 131-142.

Saraf A.S. (2010), Applications of novel drug delivery systems for herbal formulations. *Fitoterapia* 81, 680-689.

Schiffelers R.M., Storm G., den Kate M.T., Stearne-Cullen L.E., den Hollander J.G., Verbrugh H.A., Bakker-Woudenberg I.A. (2001), *In vivo* synergistic interaction of liposome-coencapsulated gentamicin and ceftazidime. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298, 369-375.

Schroeder A., Kost J., Barenholz Y. (2009), Ultrasound liposomes and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drug from liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* 162, 1-16.

Seddon J.M., Temper R.H.(1995), *Handbook of biological physics. Polymorphism in lipid-water systems* (ed. Lipowsky R, Sackmann E.), Elsevier Science B. V.

Seeram N.R., Schutzki R., Chandra A., Nair M.G. (2002), Characterization, quantification and bioactivities of anthocyanins in *Cornus species*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2519-2523.

Sessa G., Weissmann G. (1970), Incorporation of lysozyme into liposomes-A model for structure-linked latency. *Journal of Biological Chemistry* 245, 3295-3301.

Shamsa F., Ahmadiani A., Khosrokhavar R. (1999), Antihistaminic and anticholinergic activity of barberry fruit (*Berberis vulgaris*) in the guinea-pig ileum. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 161-166.

Shrivastava S., Chattopadhyay A. (2007), Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics using different fluorescent reporter probes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356, 705-710.

Sikorski Z.E. (2009), *Chemia żywności*, WNT, ISBN: 978-83-204-3628-0.

Silvander M., Bergstrand N., Edwards K. (2003), Linkage identity is a major factor on determining the effect of PEG-ylated surfactants on permeability of phosphatidylcholine liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* 126, 77-83.

- Singh M., Srivastava S., Rawat A.K.S. (2007), Antimicrobial activities of Indian *Berberis* species. *Fitoterapia* 78, 574-567.
- Sinico Ch., De Logu A., Lai F., Valenti D., Manconi M., Loy G., Bonsignore L., A.M. Fadda (2005), Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 59, 161-168.
- Soto M.A., Sotomayor C.P., Lissi E.A. (2003), Peroxyl radicals promoted changes in water permeability through gramicidin channels in DPPC and lecithin-PC vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids* 123, 77-86.
- Srisuk P., Thongnopnua P., Raktanonchai U., Kanokpanont S. (2012), Physico-chemical characteristics of methotrexate-entrapped oleic acid-containing deformable liposomes for in vitro transepidermal delivery targeting psoriasis treatment. *International Journal of Pharmaceutics* 427, 426-434.
- Stebelska K., Wyrozumska P., Grzybek M., Sikorski A.F. (2002), Charakterystyka i medyczne zastosowania konstrukcji liposomowych. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 11, 229-242.
- Stobiecki M., Matysiak-Kata I., Frański R., Skąła J., Szopa J. (2003), Monitoring changes in anthocyanin and steroid alkaloid glycoside content in lines of transgenic potato plants using liquid chromatography/mass spectrometry. *Phytochemistry* 62, 959-969.
- Stryer L. (2003), *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, ISBN 83-01-13978-1.
- Subbarao N.K., MacDonald R.C. (1994), Lipid unsaturation influences melittin-induced leakage of vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1189, 101-107.
- Sugihara N., Ohnishi M., Imamura M., Furuno K. (2001), Differences In antioxidative efficiency of catechins In various metalinduced peroxidations in cultured hepatocytes. *Journal of Health Science* 47, 99-106.
- Sultana N., Lee N.H. (2007), Antielastase and free radical scavenging activities of compounds from the stems of *Cornus kousa*. *Phytotherapy Research* 21, 1171-1176.
- Sutherland B.A., Rahman R.M.A., Appleton I. (2006), Mechanism of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17, 291-306.
- Szoka F., Papahadjopoulos D. (1978), Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Biochemistry* 75(9), 4194-4198.
- Takahashi M., Uechi S., Takara K., Asikin Y., Wada K. (2009), Evaluation of an Oral Carrier System in Rats: Bioavailability and Antioxidant Properties of Liposome-
- Tammela P., Laitinen L., Galkin A., Wennberg T., Heczko R., Vuorela H., Slotte J.P., Vuorela P. (2004), Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipid vesicles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 425, 193-199.
- Tang L. Zhang Y., Qian Z., Shen X. (2000), The mechanism of Fe²⁺-initiated lipid peroxidation in liposomes: the dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxyl radical. *Biochemical Journal* 352, 27-38.

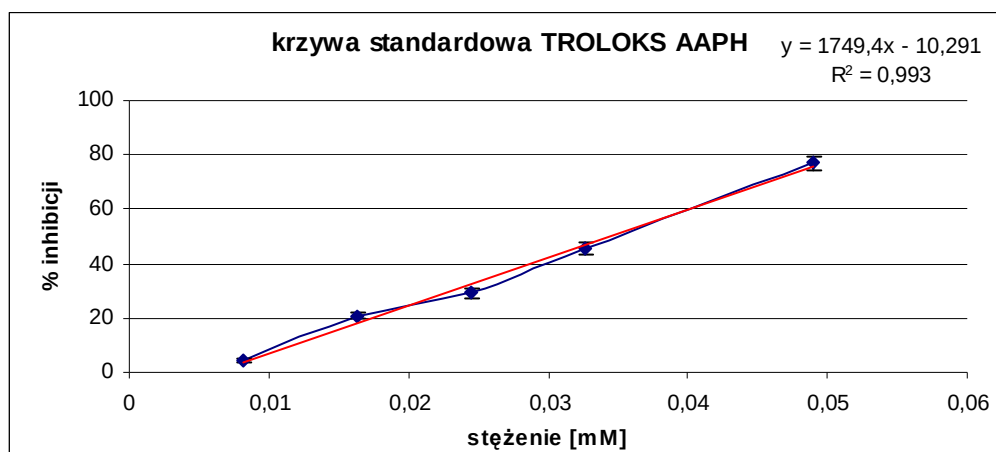
- Tapiero H., Tew K.D., Ba G.N. Mathe G. (2002), Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother* 56, 200-207.
- Teixeira M.L., Santos J., Silveira N.P., Brandelli A. (2008), Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 49–53.
- Tieleman D.P., Marrink S.J., Berendsen H.J.C. (1997), A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. *Biochimica et Biophysica Acta* 1331, 235-270.
- Torchilin V.P. (1996) Liposomes as delivery agents for medical imaging. *Molecular Medicine Today* 2, 242-249.
- Touitou E., Dayana N., Bergelson L., Godina B., Eliaza M. (2000), Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *Journal of Controlled Release* 65, 403-418.
- Tsuchiya H. (2001), Stereospecificity in membrane effects of catechins. *Chemico-Biological Interactions* 134, 41-54.
- Tsuda T., Shiga K., Ohshima K., Kawakishi S., Osawa T. (1996), Inhibition of lipid peroxidation and the activity oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochemical Pharmacology* 52, 1033-1039.
- Tural S., Koca I. (2008), Physico-chemical and antioxidant properties of cornelian cherry fruits (*Cornelian mas* L.) grown in Turkey. *Scientia Horticulturae* 166, 362-366.
- Uchegbu I.F., Vyas S.P. (1998), Non-ionic surfactant based vesicles niosomes) in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 172, 33–70.
- Vaes W.H.J., Ramos E.U., Verhaa H.J.M., Cramer C.J., Hermens J.L.M. (1998), Understanding and estimating membrane/water partition coefficients: approaches to derive quantitative structure property relationships. *Chemical Research Toxicology* 11, 847-854.
- Van Acker S.A.B.E., van Balen G.P., van den Berg D.J., Bast A., van der Vijgh W.J.F. (1998) Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology* 56, 935-943.
- Van Dijk C., Driessen A.J.M., Recourt K. (2000), The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. *Biochemical Pharmacology* 60, 1593-1600.
- Vareed S.K., Reddy M.K., Schutzki R.E., Nair M.G. (2006), Anthocyanins in *Cornus alternifolia*, *Cornus controversa*, *Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits. *Life Sciences* 78, 777-784.
- Vareed S.K., Schutzki R.E., Nair M.G. (2007), Lipid peroxidation, cyclooxygenase enzyme and tumor cell proliferation inhibitory compounds in *Cornus kousa* fruits. *Phytomedicine* 14, 706-709.
- Verkman A.A. (1980), The quenching of an intramembrane fluorescent probe. A method to study the binding and permeation of phloretin through bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 599, 370-379.
- Verstraeten S.V., Keen C.L., Schmitz H.H., Fraga C.G., Oteiza P.I. (2003), Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radical Biology and Medicine* 34(1), 84-92.

- Vinson J.A., Dabbagh Y.A. (1998), Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutrition Research* 18(6), 1067-1075.
- Volleková A., Košťálová D., Kettmann V., Tóth J. (2003), Antifungal activity of *Mahonia aquifolium* extract and its major protoberberine alkaloids. *Phytotherapy Research* 17, 834-837.
- Walde P., Ichikawa S. (2001), Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Bimolecular Engineering* 18, 143-177.
- Wallace T.C., Giusti M.M. (2008), Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nonacylated anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as compared to other natural/synthetic colorants. *Journal of Food Science* 73 (4), C241-C248.
- Wallace T.C. (2010), Analysis of Procyanidins and Anthocyanins in Food Products using Chromatographic and Spectroscopic Techniques, Dissertation.
- Waszkowiak K., Dolata W. (2007), The application of collagen preparations as carriers of rosemary extract in the production of processed meat. *Meat Sciences* 75, 178-183.
- Weng X., Cloutier G., Bibarot P., Durand L.G. (1996), Comparison and simulation of different levels of erythrocyte aggregation with pig, horse, sheep, calf and normal human blood. *Biorheology* 33, 365-377.
- Were L.M., Bruce B.D., Davidson M., Weiss J. (2003), Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipids nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. *Journal of. Agricultural and Food Chemistry* 51, 8073-8079.
- Wettasinghe M., Shahidi F. (1999), Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *Food Chemistry* 67, 399-414.
- Wilska-Jeszka, J., Podśędek A. (2000), Rola flawonoidów jako antyoksydantów *in vitro* i *in vivo*. Materiały konferencyjne: Flawonoidy i ich zastosowanie, III konferencja, Rzeszów, 53-69.
- Wilska-Jeszka, J., Sosnowska, D. (2004), Flawonoidy jako nutraceutyki. Materiały konferencyjne: Flawonoidy i ich zastosowanie, V konferencja, Rzeszów, 235-247.
- Wojdyło A., Oszmiański J., Czemerys R. (2007), Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105, 940-949.
- Wong Ch. – Ch., Li H.-B., Cheng K.-W., Chen F. (2006a), A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medical plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry* 97, 705-711.
- Wong S.P., Leong L.P., Koh J.H.W. (2006b), Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry* 99, 775-583.
- Yang B., Kotani A., Arai K., Kusu F. (2001), Estimation of the Antioxidant Activities of Flavonoids from Their Oxidation Potentials. *Analytical Sciences* 17, 599-604.
- Yao L.H., Jiang Y.M., Shi J., Tomas-Barberan F.A., Daitta N., Singanusong R., Chen S.S. (2004), Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Food for Human Nutrition* 59, 113-122.

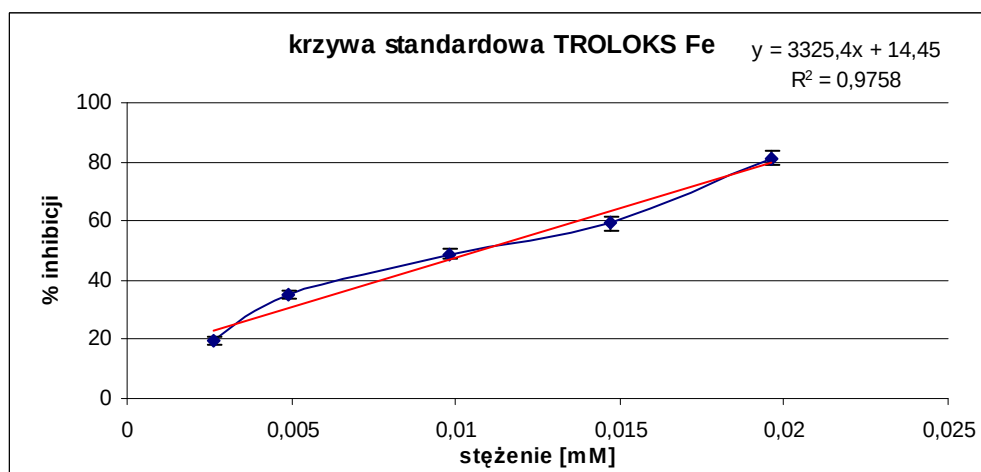
- Yarosh D.B. (2001), Liposomes In investigave dermatology. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine 17, 203-212.
- Yatvin M.B., Weinstein J.N., Dennis W.H., Blumenthal R. (1978), Design of liposomes for 1 enhanced local release of drugs by hyperthermia, Science 202, 1290-1293.
- Yeagle P.L. (1988), Cholesterol and cell membrane. [w:] Biology of Cholesterol. Ed. P.L. Yeagle, Boca Raton , FL: CRS, 121-145.
- Yen G.C., Chen H.Y. (1995), Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicu. Journal of the Agricultural and Food Chemistry 43, 27-32.
- Yokoyama S., Takeda T., Abe M. (2002), Preparation of ganglioside G_{M3} liposomes and their membrane properties, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 27, 181-187.
- Young I.S., Woodside J.V. (2001), Antioxidative in health and disease. Journal of Clinical Pathology 54, 176- 186.
- Zhang H.Y., Yang D.P, Tang G.Y. (2006), Multipotent antioxidants: from screening to design, Drug Discovery Today 11(15/16), 749-754.
- Zhao Z.S., Khan S., O'Brien P.J. (1998), Catecholic Iron Complexes as Cytoprotective Superoxide Scavengers against Hypoxia:Reoxygenation Injury in Isolated Hepatocytes. Biochemical Pharmacology 56, 825-830.
- Zheng X., Lu J., Deng L., Xiong Y., Chen J. (2009), Preparation and characterization of magnetic cationic liposome in gene delivery. International Journal of Pharmaceutics 366, 211-217.
- Zhishen J., Mengcheng T., Jiamning W. (1999), The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64, 555-559.
- Zhong H., Deng Y., Wang X., Yang B. (2005), Multivesicular liposome formulation for the sustained delivery of breviscapine. International Journal of Pharmaceutics 301, 15-24.
- Zhu T.F., Szostak J.W. (2009), Preparation of large monodisperse vesicles. PlosOne 4(4).

ZAŁĄCZNIKI

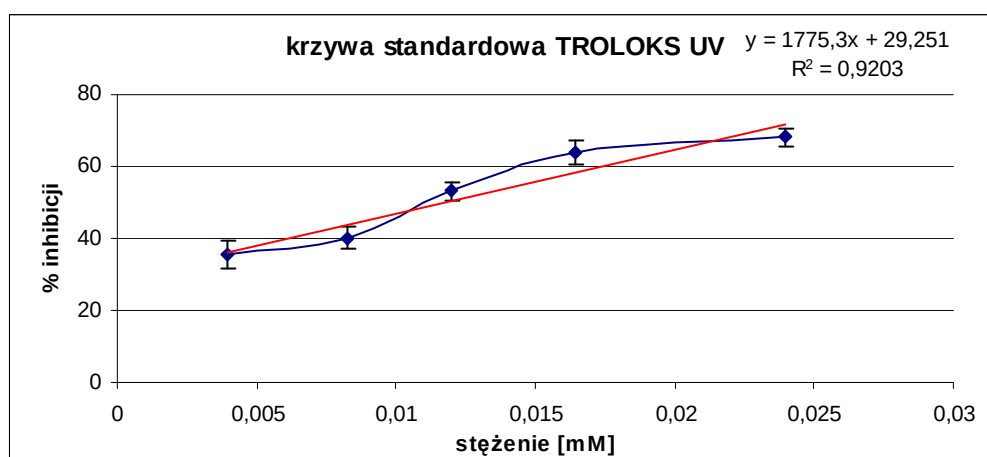
(a)



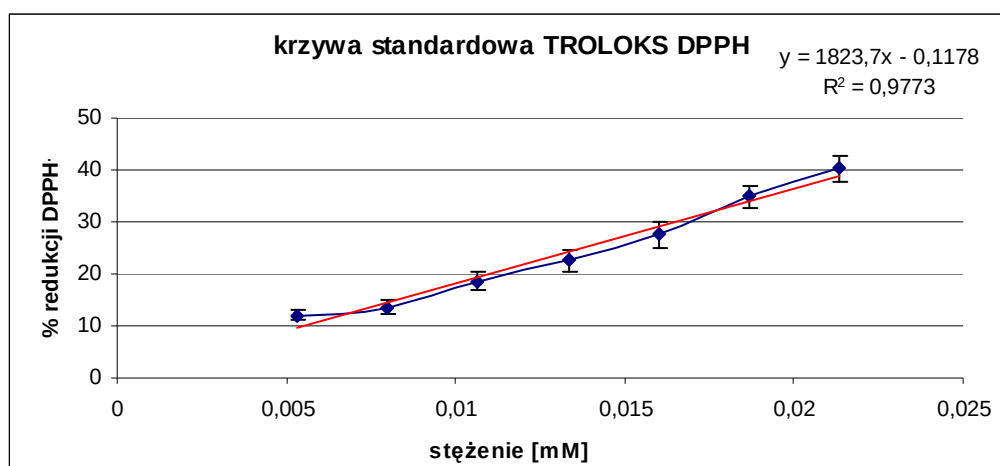
(b)



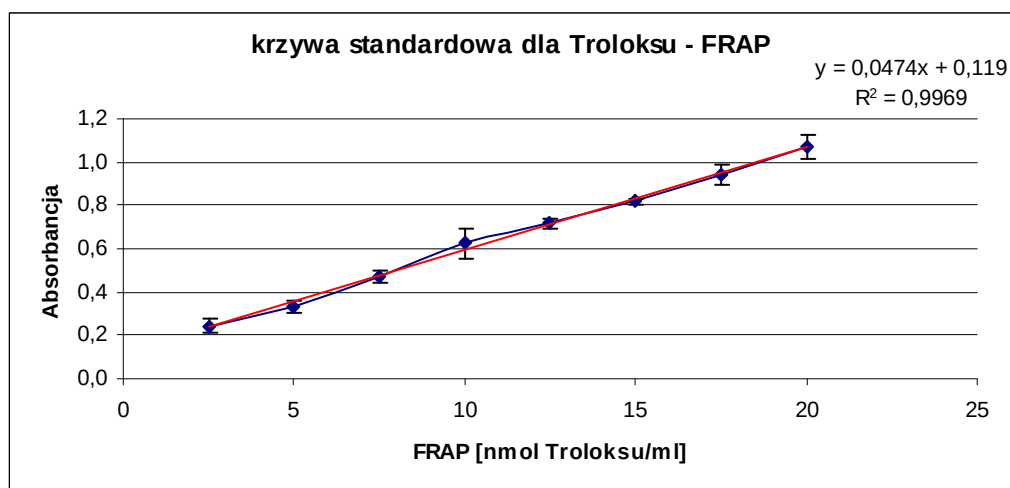
(c)



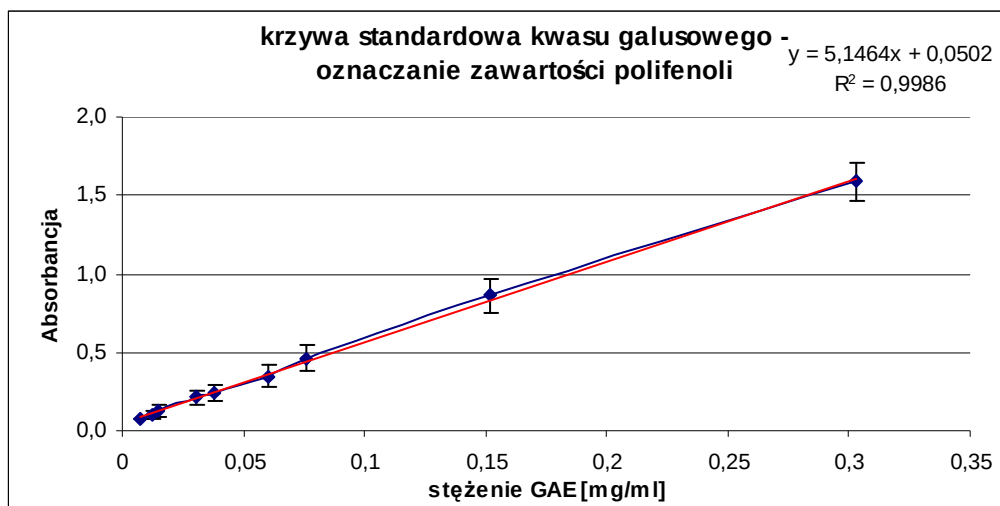
Załącznik 1. Zależność między % inhibicji utleniania błon liposomów EYPC, a stężeniem Troloksu Zawiesinę liposomów EYPC z odpowiednią ilością Troloksu oraz odpowiednią ilością rozpuszczalnika utleniania: (a) związkiem AAPH o stężeniu końcowym 20 mM, (b) Fe^{2+} /askorbinian w stosunku molowym 1:5, (c) promieniowaniem UVC 3,5 mW/cm². Objętość końcowa próby wynosiła 3 ml.



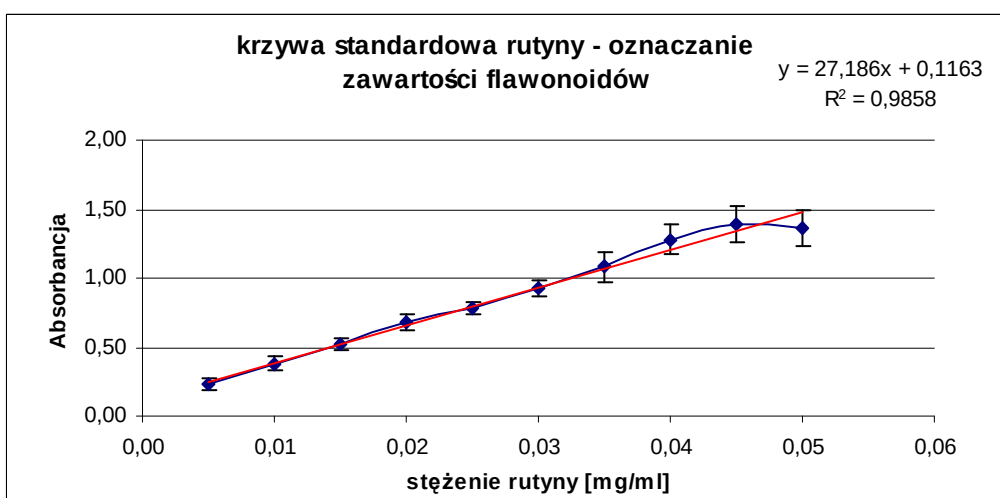
Załącznik 2. Zależność między procentem redukcji DPPH, a stężeniem Troloksu po 15 minutach inkubacji w obecności metanolowego roztworu Troloksu w następujących stężeniach 5, 8, 11, 13, 16, 19, 21 μM .



Załącznik 3. Zależność między absorbancją Troloksu z TPTZ, a zdolnością do redukowania jonów żelaza (FRAP) - 300 μl świeżo przygotowanego odczynnika FRAP (0,3 M buforu octowego, $\text{pH}=3,6$; 10 mM TPTZ w 40 mM HCl , 20 mM FeCl_3) podgrzano do 37 $^{\circ}\text{C}$. Dodawano 10 μl metanolowego Troloksu i wirowano. Absorbancję niebieskiego kompleksu Fe^{2+} -TPZT zmierzono po 10 min przy długości fali równej 595 nm. Stężenie Troloksu wynosiło: 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5; 20,0 nmol Troloksu/ml.

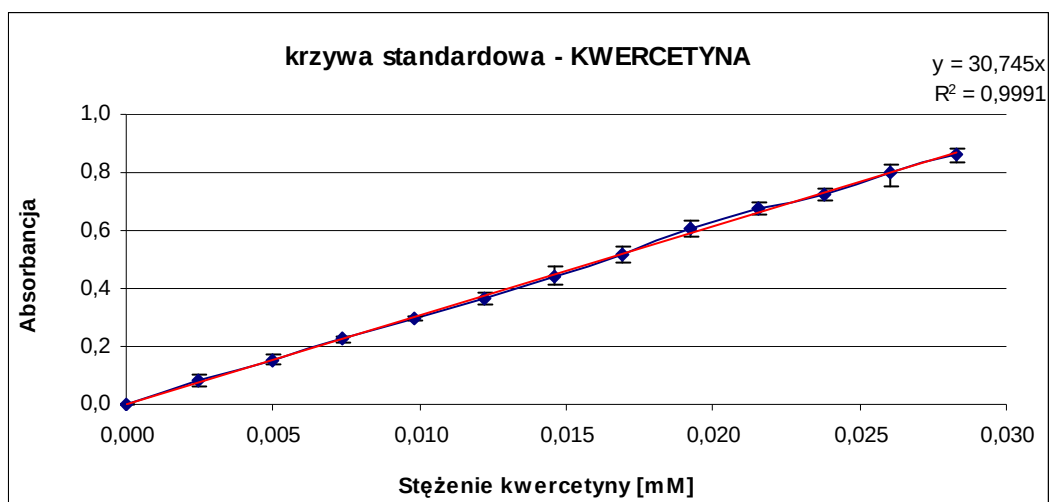


Załącznik 4. Oznaczanie zawartości polifenoli - krzywa standardowa dla kwasu galusowego Zmieszano 100 μ l odpowiednio rozcieńczonego roztworu wodnego kwasu galusowego z 200 μ l odczynnika Folin-Ciocalteu. Próbkę inkubowano w ciemności przez 3 min. Dodawano 2 ml wody destylowanej, oraz 1 ml 20% Na_2CO_3 i inkubowano, mieszając przez 1 godzinę w ciemności. Przygotowano próbę odczynnikową - zastępując objętość ekstraktu jego rozpuszczalnikiem. Wszystkie próbki odwirowano przez 10 min przy 3000 obr/min w temperaturze pokojowej. Po wirowaniu zmierzono absorbancję przy długości fali równej 750 nm. Stężenie kwasu galusowego wynosiło: 0,008; 0,012; 0,015; 0,030; 0,038; 0,061; 0,075; 0,152; 0,303 mg/ml.

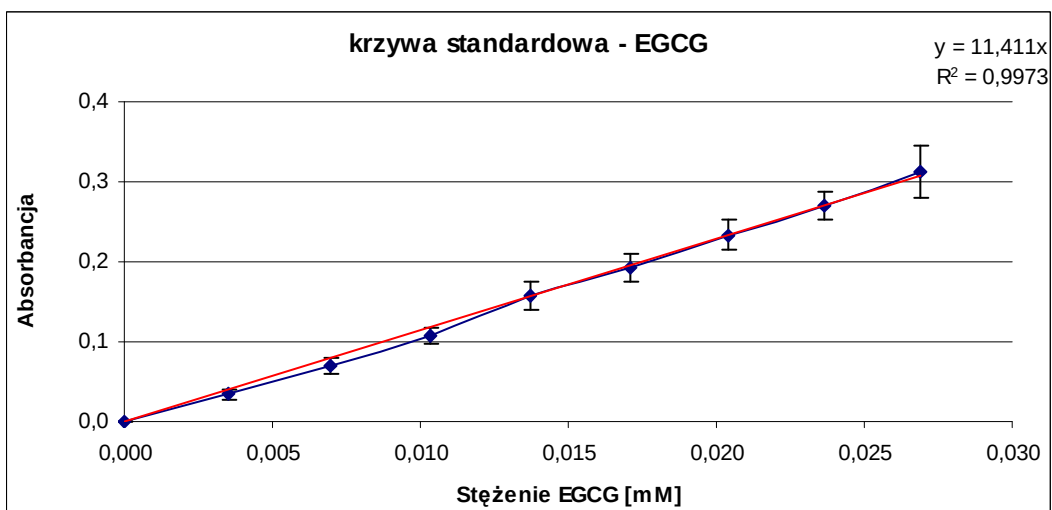


Załącznik 5. Oznaczanie zawartości flawonoidów - krzywa standardowa dla rutyny Zmieszano 1 ml metanolowego roztworu rutyny w odpowiednim stężeniu z 1 ml metanolowego roztworu 2% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Po 10 min inkubacji zmierzono absorbancję przy długości fali równej 430 nm. Stężenie rutyny wynosiło 0,23; 0,38; 0,52; 0,68; 0,78; 0,92; 1,08; 1,28; 1,38; 1,36 mg/ml.

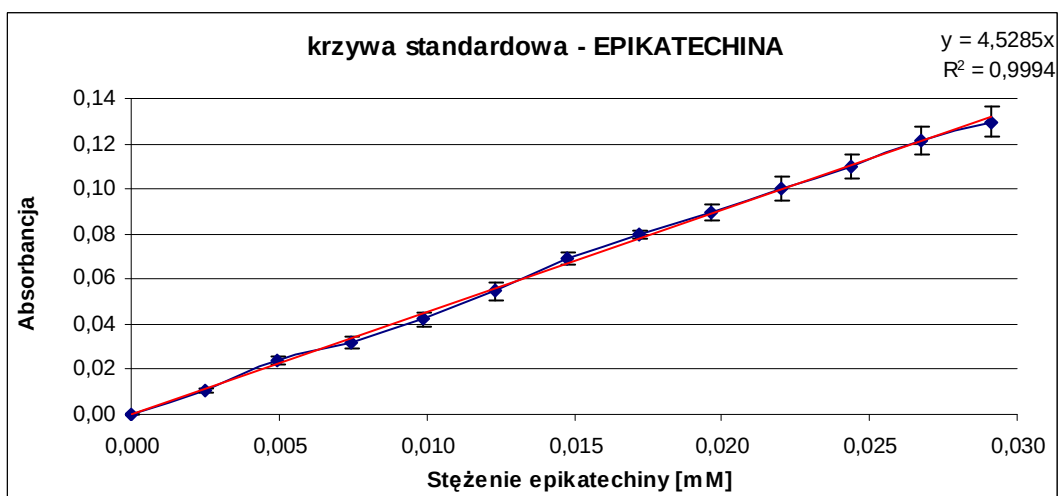
a)



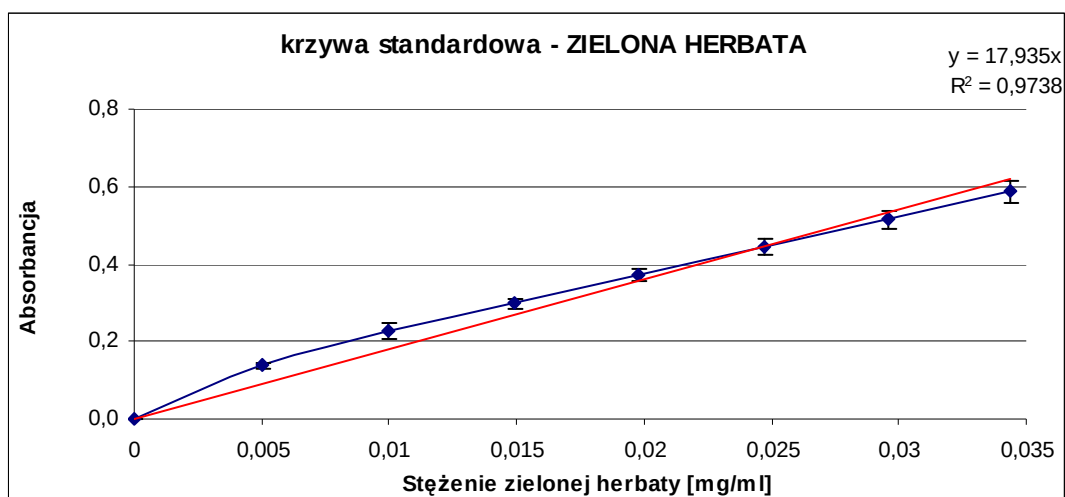
b)



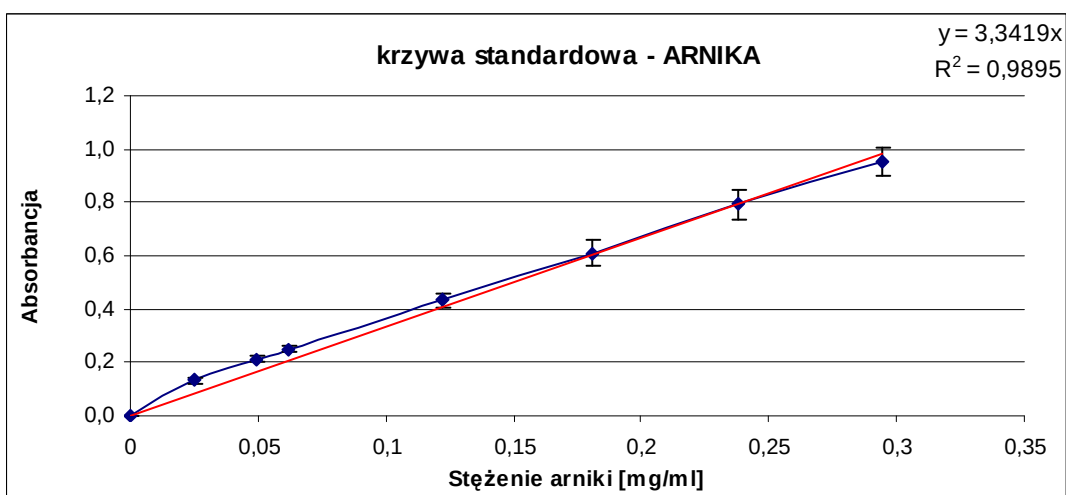
c)



d)



e)



Załącznik 6. Zależność między absorbancją, a stężeniem - krzywe standardowe dla przeciwutleniaczy zamykanych w liposomach

- (a) kwercetyna - roztwór etanolowy, krzywa wykonana przy $\lambda_{\max} = 256 \text{ nm}$
- (b) EGCG - roztwór w buforze TRIS-HCl, pH=7,4, krzywa wykonana przy $\lambda_{\max} = 275 \text{ nm}$
- (c) epikatechina - roztwór w buforze TRIS-HCl, pH=7,4, krzywa wykonana przy $\lambda_{\max} = 278 \text{ nm}$
- (d) arnika - roztwór w etanol:bufor TRIS-HCl, pH=7,4, krzywa wykonana przy $\lambda_{\max} = 325 \text{ nm}$
- (e) zielona herbata - roztwór w etanol:bufor TRIS-HCl, pH=7,4, krzywa wykonana przy $\lambda_{\max} = 276 \text{ nm}$.

Załącznik 7a.

Wartości parametrów IC_{50} [mg/ml] (stężeń przeciwutleniaczy powodujących 50% inhibicję utleniania błon liposomów EYPC indukowanych AAPH, jonami Fe^{2+} /askorbinian oraz promieniowaniem UVC) ekstraktów polifenolowych.

Parametr	berberys	SD	dereń	SD	mahonia	SD	ogórecznik	SD	arnika	SD	ziel.herb.	SD
IC_{50}^{AAPH}	0,14 c	0,01	1,13 c	0,01	0,34 b	0,03	0,08 c	0,01	0,02 c	$0,1 \cdot 10^{-2}$	$8,2 \cdot 10^{-3}$ b	$2,2 \cdot 10^{-4}$
IC_{50}^{Fe}	1,50 b	0,05	1,24 b	0,07	0,29 b	0,01	0,25 b	0,02	0,07 b	$0,4 \cdot 10^{-2}$	$8,1 \cdot 10^{-3}$ b	$2,0 \cdot 10^{-4}$
IC_{50}^{UVC}	2,69 a	0,04	6,17 a	0,06	2,35 a	0,10	1,11 a	0,08	0,09 a	$0,6 \cdot 10^{-2}$	0,29 a	0,07

a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Załącznik 7b.

Wartości parametrów IC_{50} [mg/ml] (stężeń przeciwutleniaczy powodujących 50% inhibicję utleniania błon liposomów EYPC indukowanych AAPH, jonami Fe^{2+} /askorbinian oraz promieniowaniem UVC) ekstraktów polifenolowych.

Parametr	berberys	SD	dereń	SD	mahonia	SD	ogórecznik	SD	arnika	SD	ziel.herb.	SD
IC_{50}^{AAPH}	0,14 c	0,01	1,13 a	0,01	0,34 b	0,03	0,08 c	0,01	0,02 d	$0,1 \cdot 10^{-2}$	$8,2 \cdot 10^{-2}$ e	$2,2 \cdot 10^{-4}$
IC_{50}^{Fe}	1,50 a	0,05	1,24 b	0,07	0,29 c	0,01	0,25 c	0,02	0,07 d	$0,4 \cdot 10^{-2}$	$8,1 \cdot 10^{-2}$ e	$2,0 \cdot 10^{-4}$
IC_{50}^{UVC}	2,69 b	0,04	6,17 a	0,06	2,35 c	0,10	1,11 d	0,08	0,09 f	$0,6 \cdot 10^{-2}$	0,29 e	0,07

a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Załącznik 8a.

Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów roślinnych wyrażona jako TEAC (ang. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) [mM Troloksu/100 g FM].

Parametr	berberys	SD	dereń	SD	mahonia	SD	ogórecznik	SD	arnika	SD	ziel.herb.	SD
TEAC^{AAPH}	24,17 a	1,54	3,00 a	0,03	9,94 a	0,74	43,35 a	2,90	157,21 a	8,13	422,87 a	13,40
TEAC^{Fe}	0,71 b	0,02	0,87 b	0,05	3,72 b	0,14	4,25 b	0,28	15,10 b	0,75	132,00 b	1,34
TEAC^{UVC}	0,45 b	0,01	0,20 b	$0,2 \cdot 10^{-2}$	0,51 c	0,02	1,09 b	0,08	14,20 b	1,01	4,14 c	0,09

a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Załącznik 8b.

Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów roślinnych wyrażona jako TEAC (ang. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) [mM Troloksu/100 g FM].

Parametr	berberys	SD	dereń	SD	mahonia	SD	ogórecznik	SD	arnika	SD	ziel.herb.	SD
TEAC^{AAPH}	24,17 d	1,54	3,00 f	0,03	9,94 e	0,74	43,35 c	2,90	157,21 b	8,13	422,87 a	13,40
TEAC^{Fe}	0,71 d	0,02	0,87 d	0,05	3,72 c	0,14	4,25 c	0,28	15,10 b	0,75	132,00 a	1,34
TEAC^{UVC}	0,45 c	0,01	0,20 c	$0,2 \cdot 10^{-2}$	0,51 c	0,02	1,09 c	0,08	14,20 a	1,01	4,14 b	0,09

a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Załącznik 9.

Aktywność przeciwrodnikowa ekstraktów polifenolowych wyrażona jako TEAA (ang. Trolox Equivalent Antioxidant Activity) [mM Troloks/100 g FM] oraz zdolność do redukcji jonów żelaza wyrażona jako FRAP (ang. Ferric Reducing Antioxidant Power) [μ M TE / g FM].

Parametr	berberys	SD	dereń	SD	mahonia	SD	ogórecznik	SD	arnika	SD	ziel.herb.	SD
TEAA ^{DPPH}	4,18 d	0,21	1,96 d	0,02	2,96 d	0,12	24,13 c	1,47	78,83 b	4,23	229,33 a	16,26
FRAP	20,09 d	0,88	13,81 d	0,60	12,37 d	0,42	132,96 c	6,09	330,50 b	13,12	2794,74 a	76,77

a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

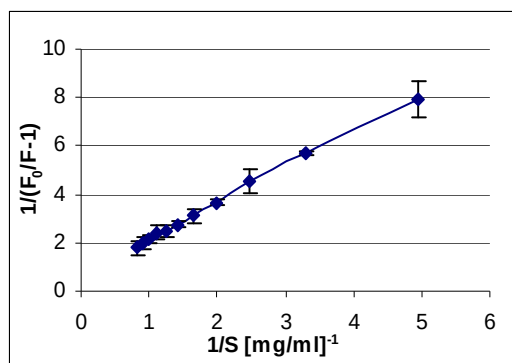
Załącznik 10.

Zawartość polifenoli [mg GAE/100g FM], flawonoidów [mg RE/100g FM] oraz antocyjanów [mg cyjanidyno-3-glukozydu/100g FM] w ekstraktach polifenolowych.

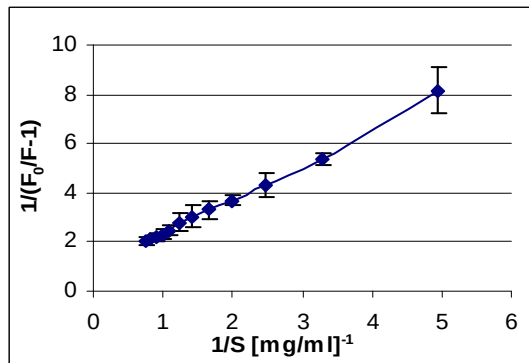
Parametr	berberys	SD	dereń	SD	mahonia	SD	ogórecznik	SD	arnika	SD	ziel.herb.	SD
polifenole	1024,31 d	15,20	339,36 d	4,59	806,19 d	6,44	4411,96 c	303,01	14323,29 b	1135,20	37964,52 a	1713,96
flawonoidy	86,03 d	1,84	63,86 d	3,04	78,17 d	1,81	1492,86 c	69,54	3676,15 b	170,81	5723,18 a	285,09
antocyjany	45,89 b	2,17	49,94 b	2,24	226,63 a	4,46	-	-	-	-	-	-

a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

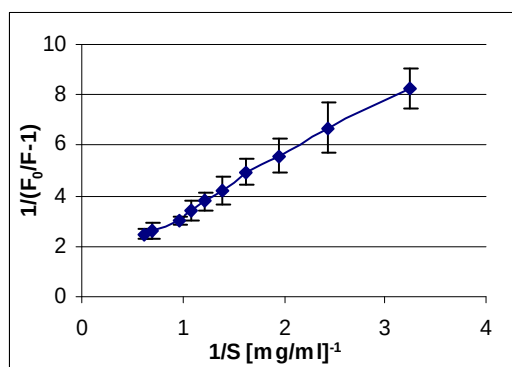
(a)



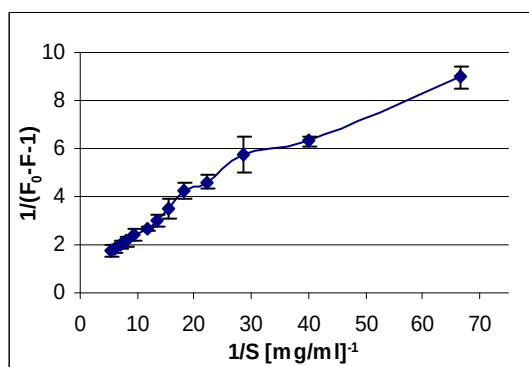
(b)



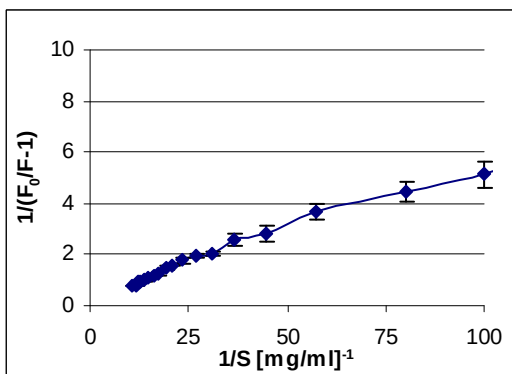
(c)



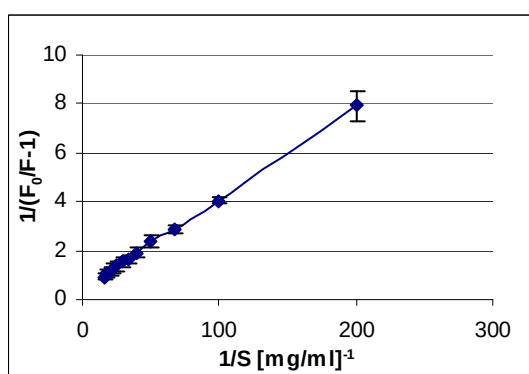
(d)



(e)



(f)



Załącznik 11.

Wykresy Sterna – Volmera wygaszania intensywności fluorescencji sondy DPH wbudowanej do błon liposomów EYPC przez ekstrakty polifenolowe:

- (a) berberys
- (b) dereń
- (c) małonię
- (d) ogórecznik
- (e) arnikę
- (f) zieloną herbatę.

Załącznik 12.

Wartości współczynnika podziału w układzie oktanol:bufor wyznaczone jako log P oraz stałych dysocjacji jako K_d [mg/ml] w układzie liposom:bufor ekstraktów roślinnych.

Parametr	berberys	SD	dereń	SD	mahonia	SD	ogórecznik	SD	arnika	SD	ziel.herb.	SD
log P	-0,25 c	0,02	-0,38 d	0,02	-0,27 c	0,02	0,52 a	0,03	0,30 b	0,06	0,54 a	0,03
K_d	1,16 c	0,07	2,55 a	0,08	1,57 b	0,10	$1,27 \cdot 10^{-2}$ d	$8,90 \cdot 10^{-4}$	$6,26 \cdot 10^{-3}$ d	$1,61 \cdot 10^{-4}$	$4,66 \cdot 10^{-3}$ d	$1,10 \cdot 10^{-4}$

a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Załącznik 13a.

Wartości parametrów IC_{50} [μM] (stężeń przeciwutleniaczy powodujących 50% inhibicję utleniania błon liposomów EYPC indukowanych AAPH, jonami Fe^{2+} /askorbinian oraz promieniowaniem UVC) badanych flawonoidów.

Parametr	cyjanidyna	SD	cyjanidyno-3-galaktozyd	SD	kwercetyna	SD	kwercetyno-3-galaktozyd	SD
IC_{50}^{AAPH}	10,12 b	0,30	18,21 c	0,58	1,01 b	0,07	4,43 b	0,29
IC_{50}^{Fe}	1,48 c	0,06	24,04 b	1,00	3,15 a	0,18	11,84 a	0,50
IC_{50}^{UVC}	56,03 a	2,40	1300,02 a	33,32	1,80 b	0,06	4,43 b	0,31

Parametr	kwask chlorogenowy	SD	EGCG	SD	epikatechina	SD
IC_{50}^{AAPH}	8,29 c	0,43	2,90 c	0,07	5,02 b	0,04
IC_{50}^{Fe}	77,61 b	1,50	8,76 b	0,17	1,97 c	0,15
IC_{50}^{UVC}	236,04 a	9,69	38,62 a	1,65	251,41 a	16,51

a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Załącznik 13b.

Wartości parametrów IC_{50} [μM] (stężeń przeciwutleniaczy powodujących 50% inhibicję utleniania błon liposomów EYPC indukowanych AAPH, jonami Fe^{2+} /askorbinian oraz promieniowaniem UVC) badanych flawonoidów.

Parametr	cyjanidyna	SD	cyjanidyno-3-galaktozyd	SD	kwercetyna	SD	kwercetyno-3-galaktozyd	SD
IC_{50}^{AAPH}	10,12 a	0,30	18,21 a	0,58	1,01 c	0,07	4,43 b	0,29
IC_{50}^{Fe}	1,48 d	0,06	24,04 b	1,00	3,15 d	0,18	11,84 b	0,50
IC_{50}^{UVC}	56,03 d	2,40	1300,02 a	33,32	1,80 g	0,06	4,43 f	0,31

Parametr	kwask chlorogenowy	SD	EGCG	SD	epikatechina	SD
IC_{50}^{AAPH}	8,29 b	0,43	2,90 b	0,07	5,02 b	0,04
IC_{50}^{Fe}	77,61 a	1,50	8,76 c	0,17	1,97 d	0,15
IC_{50}^{UVC}	236,04 c	9,69	38,62 e	1,65	251,41 b	16,51

a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Załącznik 14a.

Wartości TEAC flawonoidów.

Parametr	cyjanidyna	SD	cyjanidyno-3-galaktozyd	SD	kwercetyna	SD	kwercetyno-3-galaktozyd	SD
TEAC^{AAPH}	3,36 b	0,10	1,83 a	0,04	33,77 a	2,44	7,68 a	0,52
TEAC^{Fe}	7,25 a	0,29	0,44 b	0,02	3,40 c	0,19	0,91 c	0,04
TEAC^{UVC}	0,21 c	0,01	0,01 c	$0,21 \cdot 10^{-3}$	6,68 b	0,22	2,72 b	0,19

Parametr	kwask chlorogenowy	SD	EGCG	SD	epikatechina	SD
TEAC^{AAPH}	4,11 a	0,21	11,72 a	0,29	6,77 a	0,06
TEAC^{Fe}	0,14 b	$0,32 \cdot 10^{-2}$	1,22 b	0,02	5,46 b	0,44
TEAC^{UVC}	0,05 b	$0,22 \cdot 10^{-2}$	0,31 c	0,01	0,05 c	$0,32 \cdot 10^{-2}$

a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Załącznik 14b.

Wartości TEAC flawonoidów.

Parametr	cyjanidyna	SD	cyjanidyno-3-galaktozyd	SD	kwercetyna	SD	kwercetyno-3-galaktozyd	SD
TEAC ^{AAPH}	3,36 e	0,10	1,83 f	0,04	33,77 a	2,44	7,68 c	0,52
TEAC ^{Fe}	7,25 a	0,29	0,44 e	0,02	3,40 c	0,19	0,91 d	0,04
TEAC ^{UVC}	0,21 c	0,01	0,01 d	$0,21 \cdot 10^{-3}$	6,68 a	0,22	2,72 b	0,19

Parametr	kwasklorogenowy	SD	EGCG	SD	epikatechina	SD
TEAC ^{AAPH}	4,11 d	0,21	11,72 b	0,29	6,77 c	0,06
TEAC ^{Fe}	0,14 f	$0,32 \cdot 10^{-2}$	1,22 d	0,02	5,46 b	0,44
TEAC ^{UVC}	0,05 d	$0,22 \cdot 10^{-2}$	0,31 c	0,01	0,05 d	$0,32 \cdot 10^{-2}$

a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

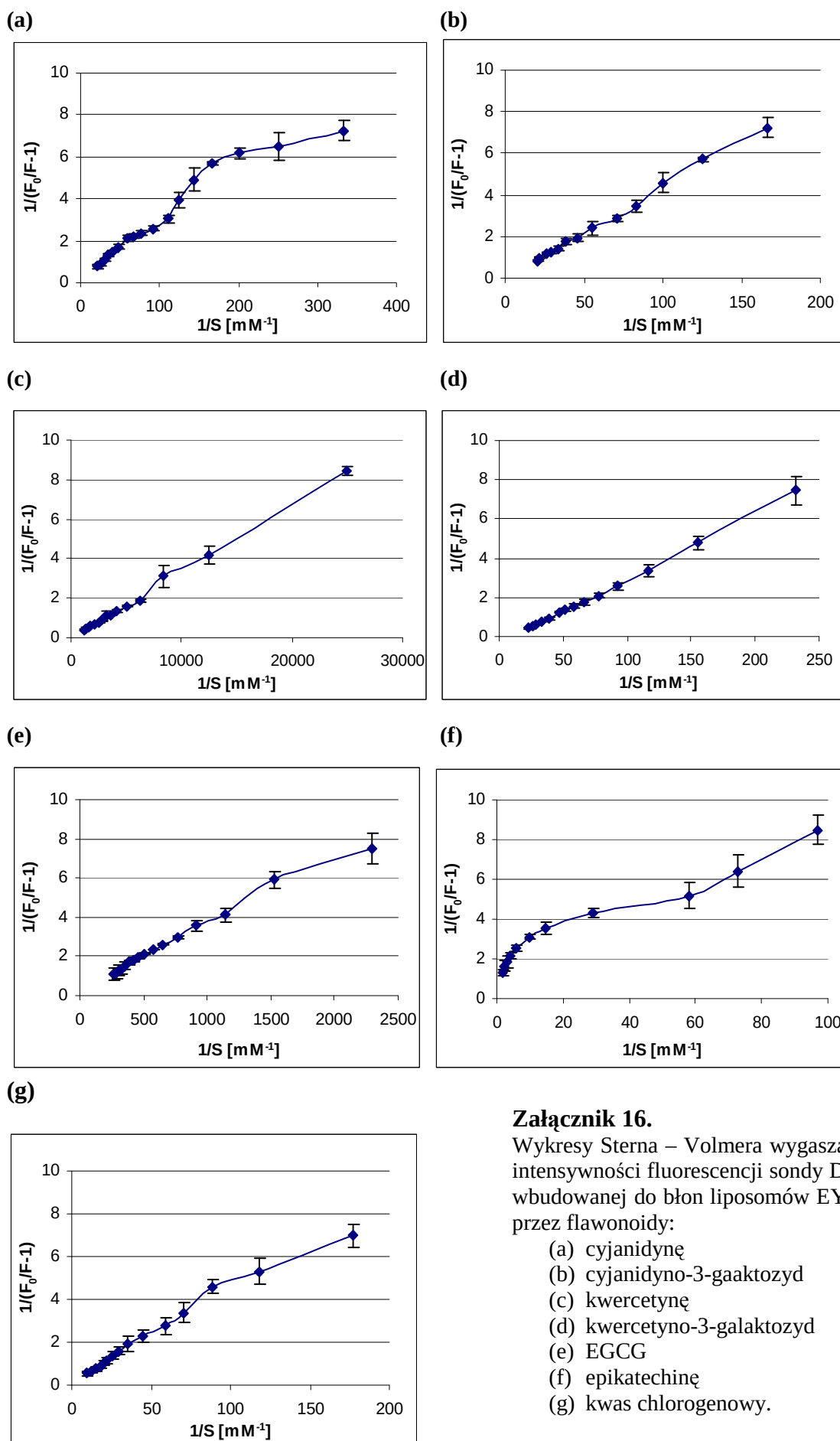
Załącznik 15.

Właściwość przeciwrodnikowa badanych flawonoidów wyrażona jako TEAA (ang. Trolox Equivalent Antioxidant Activity) oraz zdolność do redukcji jonów żelaza wyznaczona jako FRAP (ang. Ferric Reducing Antioxidant Power).

Parametr	cyjanidyna	SD	cyjanidyno-3-galaktozyd	SD	kwercetyna	SD	kwercetyno-3-galaktozyd	SD
TEAA ^{DPPH}	2,35 c	0,03	2,16 c	0,07	3,63 b	0,13	3,48 b	0,20
FRAP	6,88 a	0,36	3,52 d	0,21	5,10 b	0,28	1,63 f	0,03

Parametr	kwask chlorogenowy	SD	EGCG	SD	epikatechina	SD
TEAA ^{DPPH}	1,92 d	0,02	4,74 a	0,11	3,65 b	0,10
FRAP	2,40 e	0,12	4,30 c	0,20	3,35 d	0,17

a, b, c – grupy jednorodnie w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.



Załącznik 16.

Wykresy Sterna – Volmera wygaszania intensywności fluorescencji sondy DPH wbudowanej do błon liposomów EYPC przez flawonoidy:

- (a) cyjanidynę
- (b) cyjanidyno-3-gaaktozyd
- (c) kwercetynę
- (d) kwercetyno-3-galaktozyd
- (e) EGCG
- (f) epikatechinę
- (g) kwas chlorogenowy.

Załącznik 17.

Wartości współczynnika podziału w układzie oktanol:bufor wyznaczone jako log P oraz stałych dysocjacji jako K_d [μM] w układzie liposom:bufor dla badanych flawonoidów.

Parametr	cyjanidyna	SD	cyjanidyno-3-galaktozyd	SD	kwercetyna	SD	kwercetyno-3-galaktozyd	SD
log P	-1,42 f	0,04	-1,53 g	0,07	1,43 a	0,07	1,09 b	0,04
K_d	4,24 c	0,19	5,18 b	0,18	0,11 g	$6,93 \cdot 10^{-3}$	3,16	0,13

Parametr	kwask chlorogenowy	SD	EGCG	SD	epikatechina	SD
log P	-0,99 e	0,03	0,98 c	0,04	0,40 d	0,02
K_d	6,43 a	0,44	0,62 f	0,02	2,31 e	0,18

a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Załącznik 18.

Wartości procentowego wypływu CF oraz procentowej efektywności zamykania CF w liposomach utworzonych z lipidów o różnej długości łańcucha węglowodorowego.

skład	wypływ CF [%]	SD	efektywność zamykania CF [%]	SD
DPPC	0,68 c	0,03	0,15 b	$3,21 \cdot 10^{-3}$
18:0	0,33 d	0,01	0,11 c	$3,51 \cdot 10^{-3}$
22:0	0,13 e	0,01	0,10 d	$4,58 \cdot 10^{-3}$
EYPC	2,54 b	0,06	0,17 a	$4,93 \cdot 10^{-3}$
HSPC	2,96 a	0,07	0,07 e	$2,08 \cdot 10^{-3}$

a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Załącznik 19.

Wartości procentowego wycieku CF oraz procentowej efektywności zamykania CF w liposomach utworzonych z lipidów o różnym stopniu nasycenia łańcucha węglowodorowego.

skład	wypływ CF [%]	SD	efektywność zamykania CF [%]	SD
18:0	0,33 d	$4,51 \cdot 10^{-3}$	0,11 d	$5,13 \cdot 10^{-3}$
18:1	0,62 c	0,01	0,12 c	$3,61 \cdot 10^{-3}$
18:2	4,09 b	0,14	0,13 b	$2,52 \cdot 10^{-3}$
18:3	nd	-	nd	-
20:4	11,83 a	0,09	0,16 a	$7,64 \cdot 10^{-3}$

a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Załącznik 20.

Rozmiary liposomów uformowanych z lipidów o różnej długości łańcucha acylowego otrzymanych w wyniku sonifikowania oraz kalibrowania.

średnica	sonifikowane						kalibrowane				
[nm]	12:0	14:0	16:0	18:0	22:0	EYPC	12:0	14:0	16:0	18:0	EYPC
21,0	1,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24,4	7,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28,2	18,7	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32,7	25,3	5,5	2,3	0	0,1	2,5	0	0	0	0	0
37,8	22,6	14,3	9,4	0	1,2	11,4	0	0	0	0	0
43,8	13,4	19,3	16,7	0	4,1	20,8	0	0	0	0	2
50,7	5,5	15,7	18,5	0,3	6,2	20,2	0	0,7	0	0	7,4
58,8	1,5	9,1	15,6	4,5	5,3	11,8	3,2	5,0	3,4	2,4	12,5
68,1	0,4	5,3	11,5	13,6	2,6	4,6	13,5	14,3	10,6	10,3	13,7
78,8	0,3	2,3	8,2	19,8	0,9	1,2	24,8	22,7	20,5	19,1	12,3
91,3	0,3	1,2	5,9	18,5	0,5	0,7	25,6	23,7	23,9	21	9,5
106	0,3	0,9	4,2	13,1	1,0	1,6	19,0	17,8	19,4	16,4	9,3
122	0,3	0,8	3,0	7,8	1,5	3,0	9,5	10,1	12,2	10,0	8,3
142	0,2	0,5	2,1	4,2	1,7	4,1	3,0	4,2	5,8	5,0	7,3
164	0,1	0,8	1,3	2,4	1,4	4,7	0,5	1,2	2,1	2,2	6,3
190	0,1	0,3	0,8	1,9	0,9	4,7	0	0,2	0,6	1,2	5,0
220	0,1	0	0,3	2,1	0,3	3,9	0	0	0,2	1,3	3,3
255	0,1	0,3	0,1	2,4	0,1	2,4	0	0	0	2,0	1,6
295	0,1	0,3	0	2,6	0	1,2	0	0	0	2,6	0,6
342	0,1	0,5	0	2,5	0	0,4	0	0	0	2,6	0,2
396	0	0,2	0	2,0	0,1	0,1	0	0	0	2,1	0
459	0	0,5	0	1,3	0,3	0	0	0	0	1,2	0
531	0,1	0,6	0	0,7	0,5	0	0	0	0	0,4	0
615	0,1	0,4	0	0,2	0,6	0	0	0	0	0,1	0
712	0,1	0,1	0	0	1,2	0	0	0	0	0	0
825	0,1	0,4	0	0	4,1	0	0	0	0	0	0

Załącznik 21.

Rozmiary liposomów uformowanych z lipidów o różnej ilości wiązań podwójnych w łańcuchu acylowym otrzymanych w wyniku sonifikowania oraz kalibrowania.

średnica	sonifikowane					kalibrowane				
[nm]	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4
21,0	0	0	1,6	1,2	2,6	0	0	0	0	0
24,4	0	2,2	7,3	9,2	12,4	0	0	0	0	0
28,2	0	11,1	16,7	22,7	24	0	0	0	0	0
32,7	0	21,5	23,2	27,4	25,5	0	0	0	0	0
37,8	0	21,5	18,4	19,3	17,3	0	0	0	0	0
43,8	0	12,1	11,5	8,7	8,3	0	0	0	1,4	0
50,7	0,3	3,8	4,3	2,6	2,9	0	0,4	0	7,9	0
58,8	4,5	0,6	1,3	0,7	0,9	2,4	5,1	2,8	18,4	0,5
68,1	13,6	0,4	0,8	0,4	0,5	10,3	14,8	11,0	24,4	6,6
78,8	19,8	1,1	1,0	0,4	0,6	19,1	21,2	18,3	21,0	19,7
91,3	18,5	2,0	1,5	0,5	0,7	21,0	18,7	21,1	15,0	28,3
106	13,1	2,7	2,0	0,6	0,6	16,4	13,8	17,3	7,7	23,5
122	7,8	3,1	2,1	0,5	0,5	10,0	7,8	11,6	2,7	14,0
142	4,2	2,9	2,0	0,4	0,4	5,0	3,7	6,8	0,5	5,2
164	2,4	2,5	1,7	0,3	0,2	2,2	1,4	3,5	0	1,1
190	1,9	2,0	1,3	0,1	0,1	1,2	0,6	1,6	0	0,1
220	2,1	1,2	0,8	0	0,1	1,3	0,6	0,7	0	0
255	2,4	0,5	0,4	0	0	2,0	1,2	0,4	0	0
295	2,6	0,2	0,1	0	0	2,6	1,8	0,4	0	0
342	2,5	0	0	0	0	2,6	2,3	0,5	0	0
396	2,0	0	0	0,1	0	2,1	2,3	0,6	0	0
459	1,3	0	0	0,1	0	1,2	1,8	0,6	0	0
531	0,7	0,1	0	0,1	0,1	0,4	1,0	0,6	0	0
615	0,2	0,3	0	0,1	0,1	0,1	0,4	0,6	0	0
712	0	0,5	0	0,1	0,2	0	0,1	0,4	0	0
825	0	0,8	0	0,1	0,2	0	0	0,2	0	0

Załącznik 22.

Rozmiary liposomów z DPPC bez i z dodatkiem 40 mol % cholesterolu otrzymanych metodą FAT-s zawierających zamknięte przeciwutleniacze.

FAT												
lipid	DPPC	DPPC	DPPC	DPPC	DPPC	DPPC	DPPC	DPPC	DPPC	DPPC	DPPC	DPPC
cholesterol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
przeciwutl.	-	KWERCETYNA	EGCG	EPIKATECHINA	ZIELONA HERBATA	ARNIKA	-	KWERCETYNA	EGCG	EPIKATECHINA	ZIELONA HERBATA	ARNIKA
[nm]												
5,84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6,78	0	0	0	0	0,4	0	0	0	0	0	0	0
7,53	0	0	0	0	0,6	0	0	0	0	0	0	0
8,72	0	0	0	0,8	0,8	0	0	0	0	0	0	0
10,1	1,0	0	0,1	1,3	1,1	0	0	0,2	0	0	0	0
11,7	4,4	0	0,7	2,1	1,5	0	0,	0,6	0	0	0	0
13,5	9,1	0	2,0	3,2	2,1	0,4	1,4	1,1	0	0	0	0
15,7	12,3	0	4,5	4,7	2,9	2,2	2,8	1,3	0,1	0,3	0	0
18,2	12,8	0	7,9	6,4	4,0	6,1	5,7	2,0	0,5	1,3	0,1	0,2
21,0	11,5	0	11,8	8,3	5,2	10,7	12,7	2,5	1,5	2,7	0,3	1,4
24,4	9,5	0	14,9	9,0	6,6	13,5	17,3	4,3	6,3	5,2	1,2	4,1
28,2	7,4	2,5	16,1	10,3	7,7	13,5	15,3	12,3	9,0	8,5	4,8	16,2
32,7	5,7	9,5	14,0	11,7	12,5	11,6	9,0	17,7	14,6	14,4	6,9	19,4
37,8	4,3	16,6	8,9	10,1	14,6	9,2	7,3	15,9	19,9	16,3	12,7	15,3
43,8	3,2	18,2	3,6	9,2	10,8	6,8	6,5	10,3	17,5	15,7	17,5	9,4
50,7	2,4	14,9	0,8	6,3	6,1	4,9	5,7	8,5	10,5	8,4	13,4	7,1
58,8	1,8	10,1	0,4	3,2	3,8	3,6	4,3	6,2	6,4	5,1	8,9	5,8
68,1	1,3	6,5	0,3	1,0	2,5	2,6	3,2	4,1	3,5	3,8	6,3	4,5
78,8	1,0	4,6	0,1	0,2	1,8	2,1	2,7	2,2	2,8	6,2	5,5	3,5
91,3	0,8	3,8	0	0,6	1,2	1,7	1,4	1,8	1,9	5,3	4,9	2,7
106	0,6	3,4	0	1,3	0,8	1,5	1,2	1,6	1,7	3,1	4,3	1,8
122	0,5	2,9	0	1,9	0,6	1,2	0,9	1,4	0,5	1,5	3,6	1,5
142	0,3	2,4	0	1,8	0,5	1,0	0,5	0,4	0,3	0,7	2,6	0,8

Załącznik 23.

Rozmiary liposomów z EYPC bez i z dodatkiem 40 mol % cholesterolu otrzymanych metodą FAT-s zawierających zamknięte przeciwutleniacze.

FAT												
lipid	EYPC	EYPC	EYPC	EYPC	EYPC	EYPC	EYPC	EYPC	EYPC	EYPC	EYPC	EYPC
cholesterol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
przeciwutl.	-	KWERCETYNA	EGCG	EPIKATECHINA	ZIELONA HERBATA	ARNIKA	-	KWERCETYNA	EGCG	EPIKATECHINA	ZIELONA HERBATA	ARNIKA
[nm]												
5,84	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0
6,78	1,9	0	0	0,9	0	0	0	0	0	0	0,6	0
7,53	4,1	0	0	3,2	0	0	0,2	0	0	0	1,7	0
8,72	7,2	0	1,0	4,9	0	0	2,3	0	0	0	3,1	0
10,1	10,5	0	1,1	5,3	0,4	0,3	7,6	0	0	0,3	4,1	0,3
11,7	12,2	0	2,4	6,0	2,7	2,5	12,6	0	0	0,8	4,8	2,4
13,5	11,5	0	4,4	7,2	7,9	7,8	14,0	0	0,2	4,9	5,3	10,0
15,7	9,6	0	8,5	11,7	13,1	13,2	12,3	0	2,0	6,8	5,8	17,9
18,2	7,5	0	15,7	13,5	15,3	15,0	9,5	0	8,3	11,2	6,5	12,3
21,0	5,8	0	18,5	12,1	14,1	13,3	6,9	0	14,9	16,2	7,3	6,1
24,4	4,4	4,5	15,6	8,0	11,3	10,1	5,0	1,0	17,0	13,4	8,2	5,3
28,2	3,5	16,8	6,2	6,7	8,3	7,1	3,7	5,9	12,7	7,3	15,9	5,1
32,7	2,7	25,5	4,6	5,5	5,9	4,8	2,9	16,3	7,9	6,3	9,3	5,1
37,8	2,2	23,4	3,2	4,5	4,2	3,4	2,4	19,1	5,8	5,3	6,5	5,0
43,8	1,7	12,9	3,0	3,6	3,0	2,6	2,0	17,5	3,8	4,6	4,8	4,8
50,7	1,3	4,5	2,1	2,9	2,2	2,1	1,5	9,0	2,8	3,3	3,0	4,5
58,8	1,1	1,1	2,0	2,3	1,6	1,8	1,3	4,8	1,6	3,2	1,5	4,0
68,1	0,9	0,8	1,9	1,1	1,2	1,7	1,1	3,5	1,9	3,1	0,5	3,5
78,8	0,7	1,6	1,5	0	1,0	1,5	1,0	3,6	2,7	2,8	0,2	3,1
91,3	0,6	2,2	0	0	0,8	1,5	0,9	3,9	2,6	2,7	0	2,7
106	0,6	2,1	0	0	0,6	1,0	0,7	3,9	2,6	2,0	0	1,7
122	0,5	1,7	0	0	0,6	0,8	0,5	3,4	2,3	1,6	0	1,4
142	0,4	1,1	0	0	0,5	0,6	0,2	2,8	2,5	1,8	0	1,3

Załącznik 24.

Rozmiary liposomów z HSPC bez i z dodatkiem 40 mol % cholesterolu otrzymanych metodą FAT-s zawierających zamknięte przeciwutleniacze.

FAT												
lipid	HSPC	HSPC	HSPC	HSPC	HSPC	HSPC	HSPC	HSPC	HSPC	HSPC	HSPC	HSPC
cholesterol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
przeciwutl.	-	KWERCETYNA	EGCG	EPIKATECHINA	ZIELONA HERBATA	ARNIKA	-	KWERCETYNA	EGCG	EPIKATECHINA	ZIELONA HERBATA	ARNIKA
[nm]												
5,84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6,78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7,53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8,72	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0
10,1	0	0	0	0	0	1,0	0	0	0	0	0	0
11,7	0	0	0	0	0	3,1	0	0	0	0	0	0
13,5	0,5	0	0	0,8	0	4,9	0	0	0	0	0	0
15,7	4,0	0	0,5	4,1	0	4,6	0	0	0	0	0	0
18,2	13,8	0,2	2,0	10,8	0,8	2,8	0	0	0	0	0	0
21,0	14,5	1,6	10,2	18,0	2,4	1,3	0	0	0,3	0,5	0	0,1
24,4	12,7	5,7	15,7	20,4	9,6	1,1	0	0	1,6	1,1	0	0,1
28,2	5,6	9,8	17,5	17,2	16,3	1,7	0	0	5,2	3,3	0	0,2
32,7	2,3	17,5	12,6	12,6	17,5	2,7	0	0	8,9	7,4	0,8	0,3
37,8	2,9	21,5	11,1	8,4	11,4	13,0	0	0	13,6	17,5	1,5	0,3
43,8	3,9	18,3	6,9	4,1	8,9	14,5	0	0	17,5	25,7	4,3	0,5
50,7	2,9	7,3	5,6	0,9	7,1	12,7	1,2	3,0	14,1	18,4	5,3	1,1
58,8	2,5	5,3	4,3	0	6,5	9,5	8,6	11,7	9,0	11,3	13,0	2,2
68,1	2,9	3,2	3,4	0	5,1	3,9	15,1	19,8	4,4	5,9	21,3	5,0
78,8	3,2	2,1	2,3	0	3,9	3,8	20,1	20,2	3,9	3,5	16,6	7,5
91,3	3,5	1,5	1,3	0	2,0	3,6	17,5	15,6	3,4	2,0	11,0	14,0
106	3,6	1,2	0,5	0	1,7	3,3	12,9	12,2	2,9	1,1	4,5	18,4
122	4,2	1,1	0	0	0,5	2,8	8,0	5,7	2,3	0,8	3,7	13,7
142	3,2	0,5	0	0	0	2,1	2,9	1,5	1,6	0,5	3,1	9,8

Załącznik 25.

Rozmiary liposomów z lipidu 18:1 bez i z dodatkiem 40 mol % cholesterolu otrzymanych metodą FAT-s zawierających zamknięte przeciwutleniacze.

FAT												
lipid	18:1	18:1	18:1	18:1	18:1	18:1	18:1	18:1	18:1	18:1	18:1	18:1
cholesterol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
przeciwutl.	-	KWERCETYNA	EGCG	EPIKATECHINA	ZIELONA HERBATA	ARNIKA	-	KWERCETYNA	EGCG	EPIKATECHINA	ZIELONA HERBATA	ARNIKA
[nm]												
5,84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6,78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7,53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8,72	0	0	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0
10,1	0,6	0	1,6	0,2	0,6	0	0,4	0	0	0,3	1,6	0
11,7	2,3	0	4,3	1,7	3,5	0,5	1,9	0	1,2	2,1	8,2	0,3
13,5	5,5	0	9,4	5,8	8,6	2,3	5,4	0	5,5	6,5	13,8	2,5
15,7	9,7	0	13,7	12,7	13,2	7,0	9,9	0,5	7,2	12,0	16,2	7,2
18,2	13,0	0	15,6	17,8	15,0	12,6	13,4	1,8	14,1	15,3	17,3	11,7
21,0	14,4	0,4	13,4	15,3	14,1	13,5	14,7	3,2	15,8	15,1	14,1	14,8
24,4	12,8	2,8	9,2	12,5	11,7	11,7	12,9	7,8	14,7	12,5	11,0	12,9
28,2	11,8	9,8	7,0	10,5	8,8	10,6	11,8	15,7	13,0	9,1	6,9	10,6
32,7	9,3	19,2	5,2	7,1	6,1	7,9	9,3	21,6	8,4	7,0	4,5	8,0
37,8	6,9	22,8	3,8	4,4	4,0	6,4	6,8	16,8	4,9	8,0	2,7	6,7
43,8	4,8	17,4	2,8	2,5	3,5	5,2	4,7	11,7	2,2	5,7	1,5	3,9
50,7	3,2	8,9	2,1	1,5	2,5	4,2	3,1	6,5	1,2	2,1	0,8	2,7
58,8	2,0	3,2	1,6	0,6	1,9	2,5	2,0	2,1	0,9	1,1	0,4	1,9
68,1	1,3	1,1	1,3	0,5	1,5	1,4	1,2	1,0	0,8	0	0,2	1,4
78,8	0,7	1,0	1,1	0,3	0,6	1,1	0,8	0	0,5	0	0,1	1,1
91,3	0,4	1,6	1,0	0,1	0,3	0,9	0,4	0	0,1	0	0	0,9
106	0,2	2,1	0,9	0	0,3	0,7	0,2	0	0	0	0	0,7
122	0,1	2,3	0,8	0	0,1	0,6	0,1	0	0	0	0	0,6
142	0	2,2	0,7	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0,4

Załącznik 26.

Rozmiary liposomów z lipidu 18:2 bez i z dodatkiem 40 mol % cholesterolu otrzymanych metodą FAT-s zawierających zamknięte przeciwutleniacze.

FAT												
lipid	18:2	18:2	18:2	18:2	18:2	18:2	18:2	18:2	18:2	18:2	18:2	18:2
cholesterol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
przeciwutl.	-	KWERCETYNA	EGCG	EPIKATECHINA	ZIELONA HERBATA	ARNIKA	-	KWERCETYNA	EGCG	EPIKATECHINA	ZIELONA HERBATA	ARNIKA
[nm]												
5,84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6,78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7,53	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	1,2	0
8,72	0	0	0	0	1,1	0	1,6	0	0	0	1,1	0
10,1	0,9	0	0,4	0	3,3	0,3	6,5	0	0	0	2,3	0
11,7	6,6	2,0	1,6	0,6	5,7	1,8	12,4	0	0,2	0,9	6,5	0,3
13,5	17,3	9,6	4,3	3,4	9,3	3,6	14,6	1,9	2,2	4,2	8,2	2,5
15,7	22,3	18,2	7,7	8,3	13,6	5,5	15,3	9,7	6,7	9,4	14,7	7,2
18,2	19,2	21,8	10,6	12,4	14,0	17,9	12,9	15,8	11,2	13,9	15,3	11,7
21,0	10,9	16,5	11,8	15,6	12,2	18,5	9,9	20,5	14,2	15,7	13,6	14,8
24,4	4,8	9,6	11,4	13,2	8,1	15,1	7,3	13,2	13,5	14,0	8,0	12,9
28,2	2,3	5,1	10,0	9,6	4,3	8,7	5,2	10,3	11,0	12,7	5,6	10,6
32,7	2,2	3,4	8,1	6,7	3,7	4,3	3,7	4,8	8,6	9,8	3,2	8,0
37,8	2,7	3,0	6,3	4,3	3,1	3,2	2,7	3,2	6,5	7,0	3,0	6,7
43,8	2,9	3,0	4,8	2,5	2,5	2,9	2,0	2,8	4,8	4,7	2,1	3,9
50,7	2,7	2,6	3,6	1,3	1,8	1,3	1,4	3,0	3,6	3,0	1,6	2,7
58,8	2,1	2,0	2,8	0,6	1,1	0,5	1,1	3,0	2,8	1,9	1,4	1,9
68,1	1,4	1,3	2,3	0,2	0,5	0,6	0,8	2,8	2,3	1,1	1,1	1,4
78,8	0,6	0,7	1,8	0,1	0,2	0,3	0,6	2,3	2,0	0,6	0,3	1,1
91,3	0,1	0,2	1,3	0	0	0,1	0,4	1,9	1,7	0,2	0	0,9
106	0	0,1	0,9	0	0	0	0,3	1,5	1,4	0,1	0	0,7
122	0	0	0,5	0	0	0	0,2	1,2	1,1	0	0	0,6
142	0	0	0,3	0	0	0	0,1	0,7	0,9	0	0	0,4

Załącznik 27.

Wpływ długości łańcuchów węglowodorowych lipidu na płynność błon liposomów poprzez pomiar anizotropii fluorescencji sondy DPH.

lipid	sonifikowane A		przeciskane B	
	anizotropia	SD	anizotropia	SD
12:0	0,06 g	0,005	0,05 f	0,004
14:0	0,14 e	0,005	0,12 d	0,002
16:0	0,22 c	0,002	0,18 b	0,002
18:0	0,23 b	0,003	0,19 a	0,002
22:0	0,24 a	0,003	-	-
EYPC	0,12 f	0,005	0,11 e	0,002
HSPC	0,14 d	0,004	0,16 c	0,002

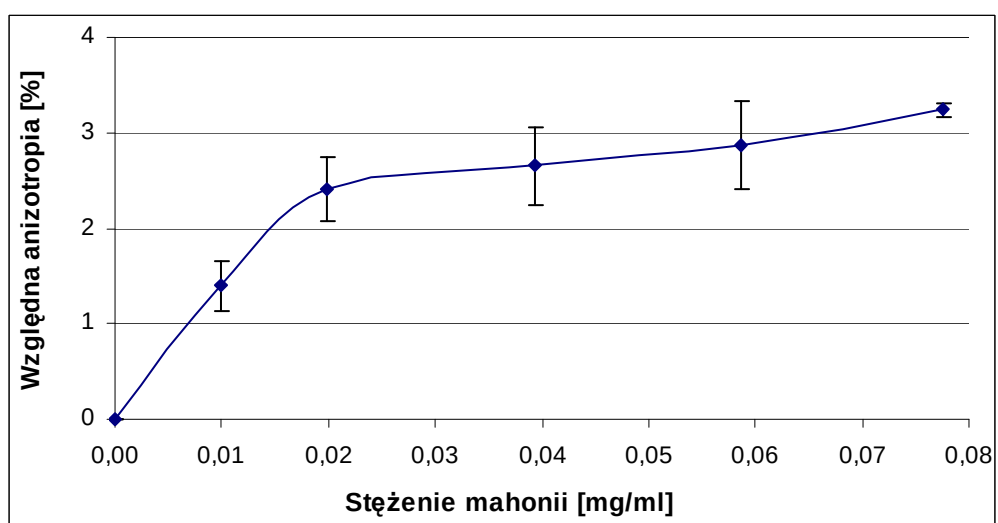
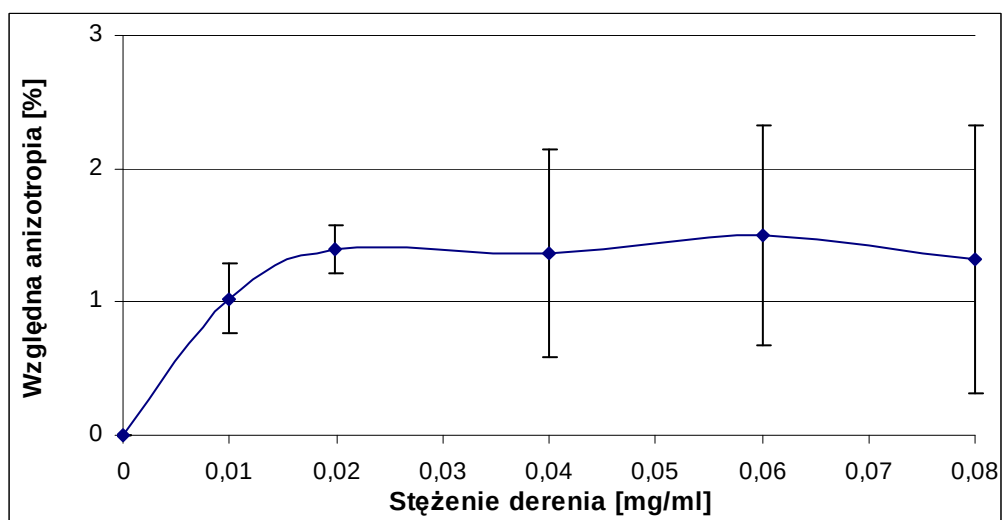
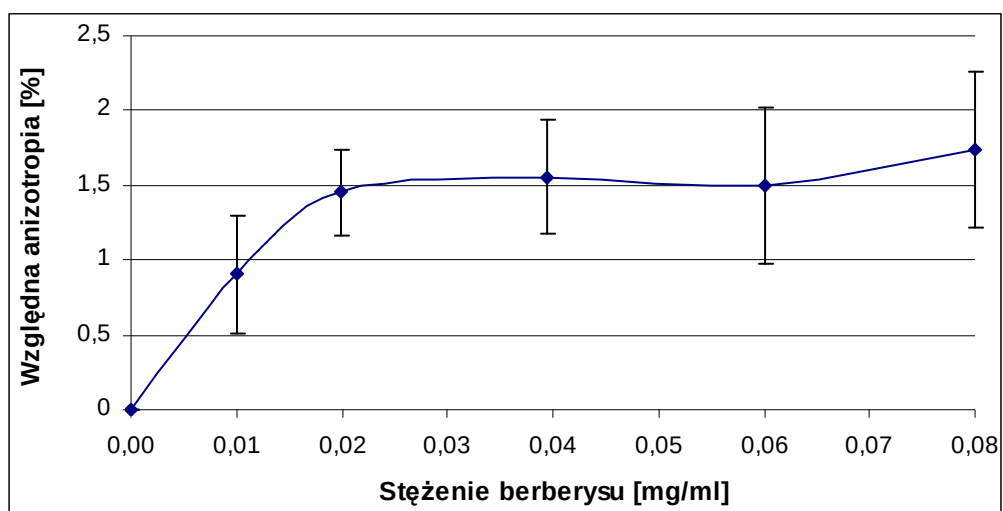
a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

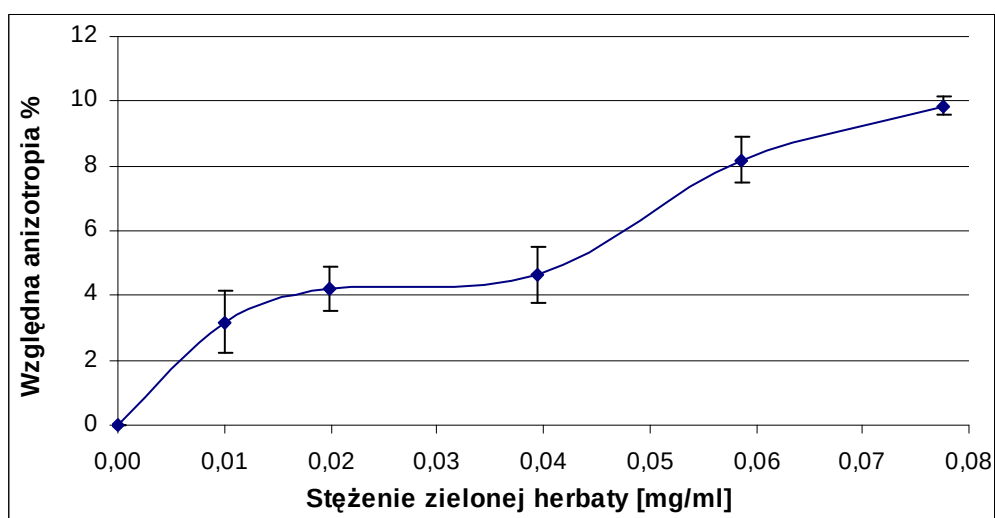
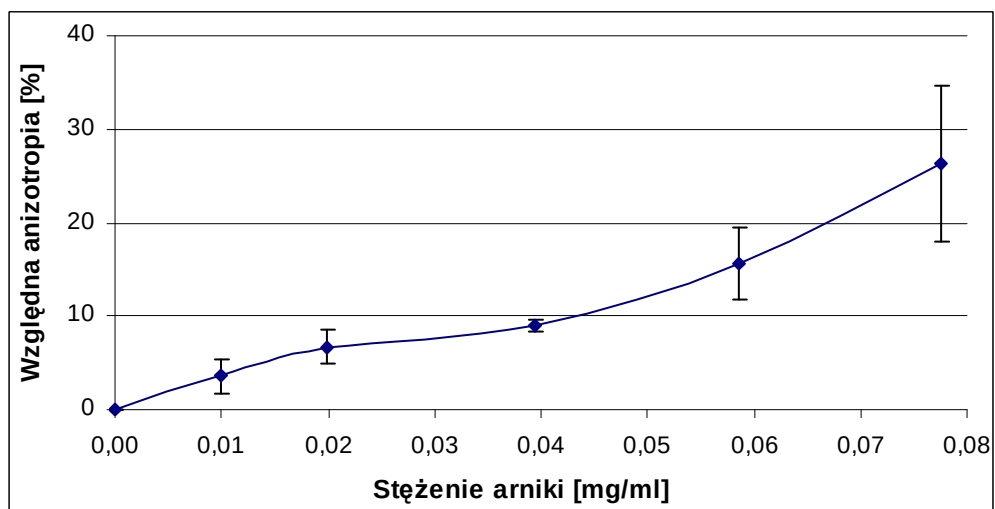
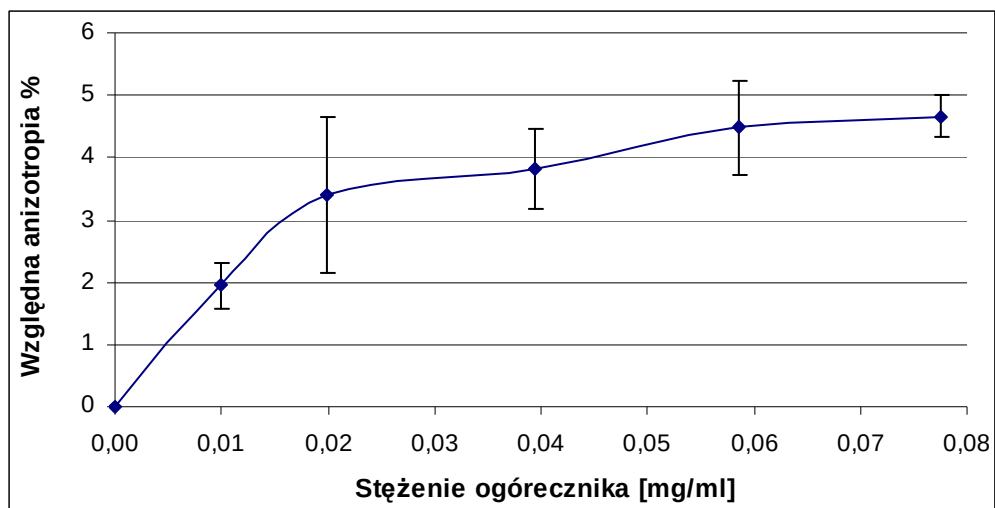
Załącznik 28.

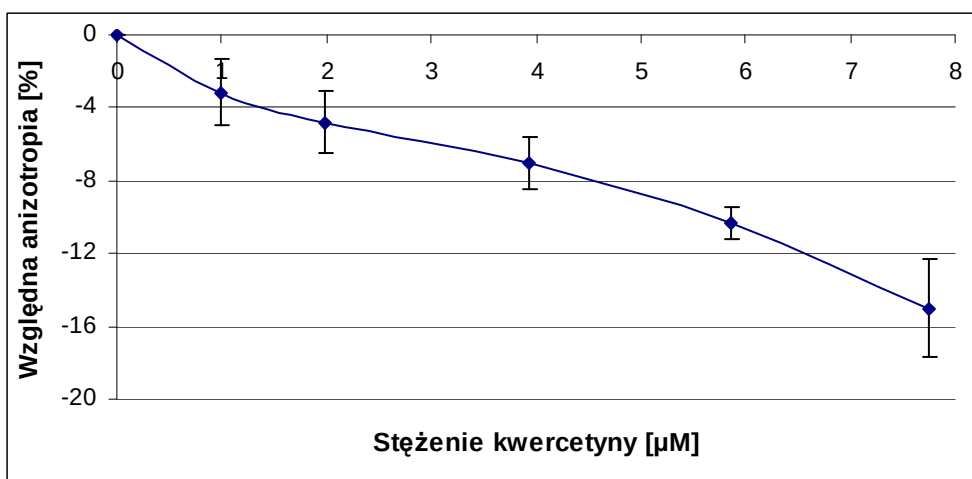
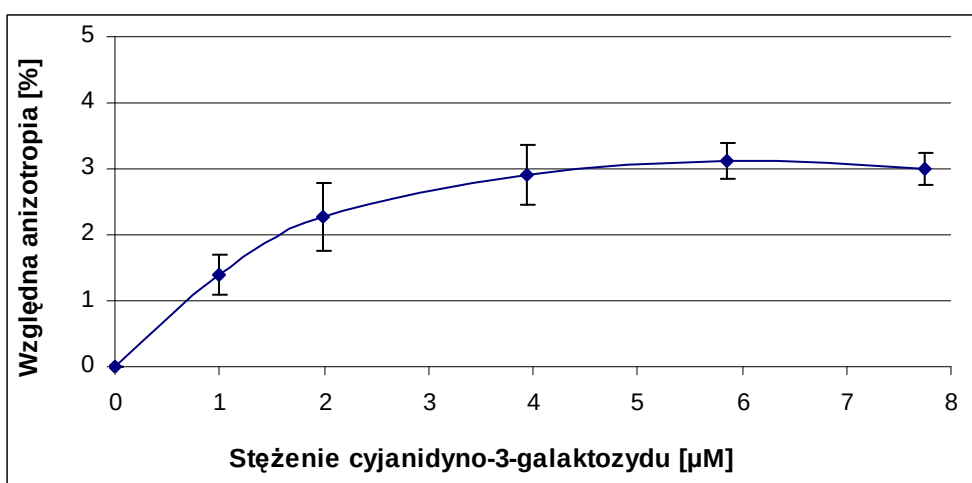
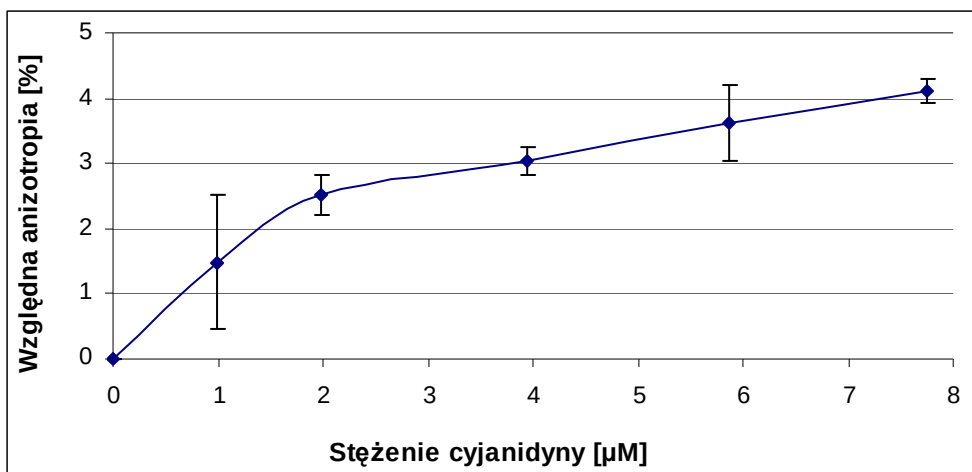
Wpływ ilości wiązań podwójnych w łańcuchu acylowym cząsteczki lipidu na płynność błon liposomów poprzez pomiar anizotropii fluorescencji sondy DPH.

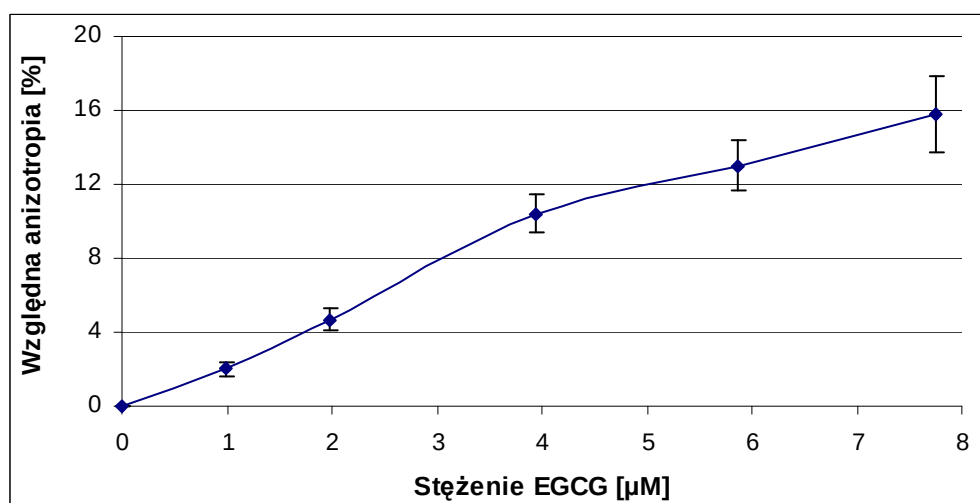
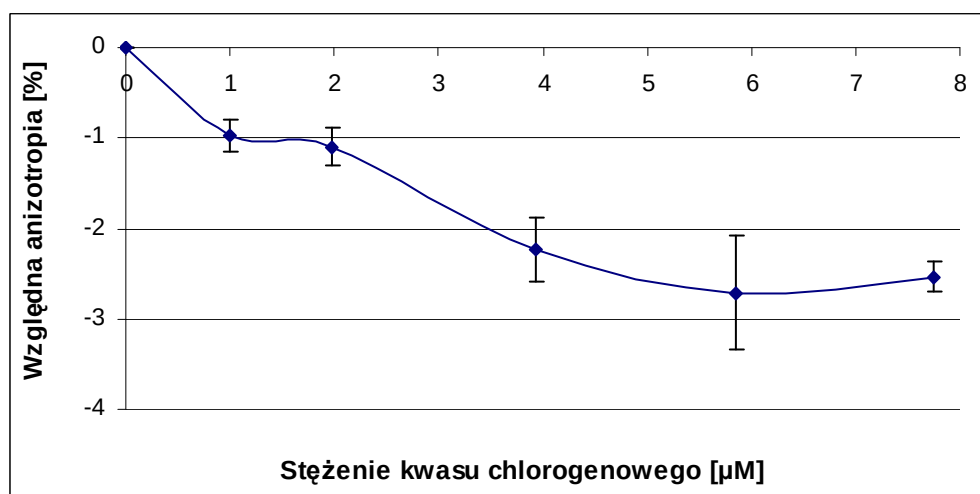
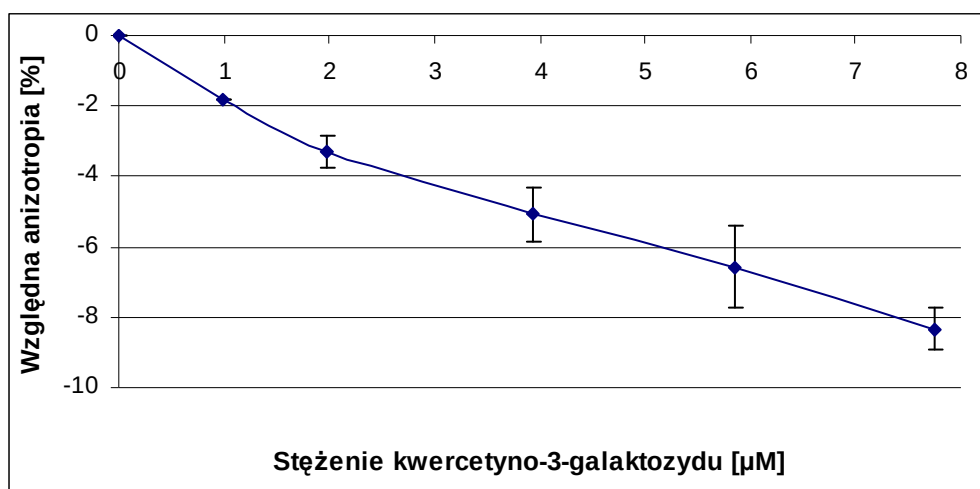
lipid	sonifikowane A		przeciskane B	
	anizotropia	SD	anizotropia	SD
18:0	0,23 a	0,005	0,19 a	0,003
18:1	0,11 c	0,002	0,11 b	0,002
18:2	0,12 b	0,003	0,09 c	0,004
18:3	0,11 c	0,005	0,09 c	0,002
20:4	0,10 d	0,002	0,11 b	0,007

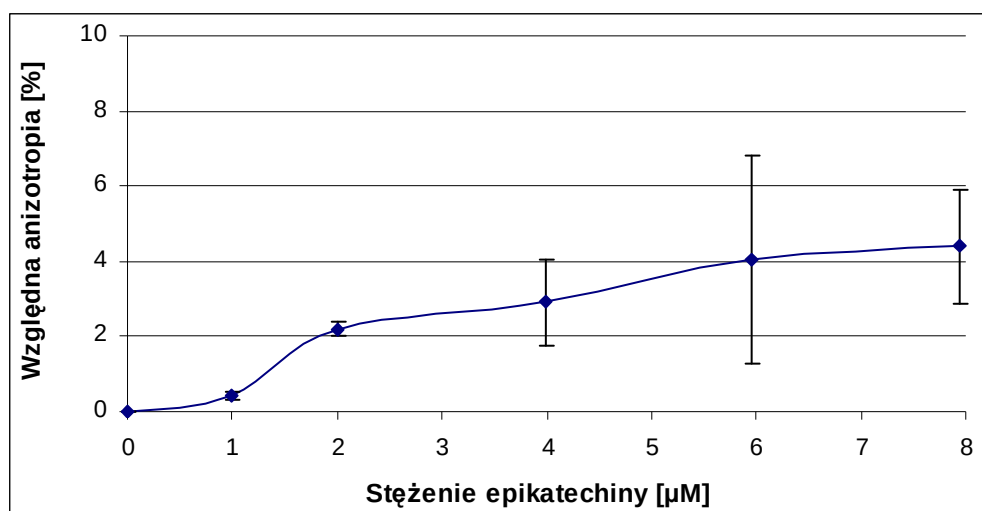
a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.











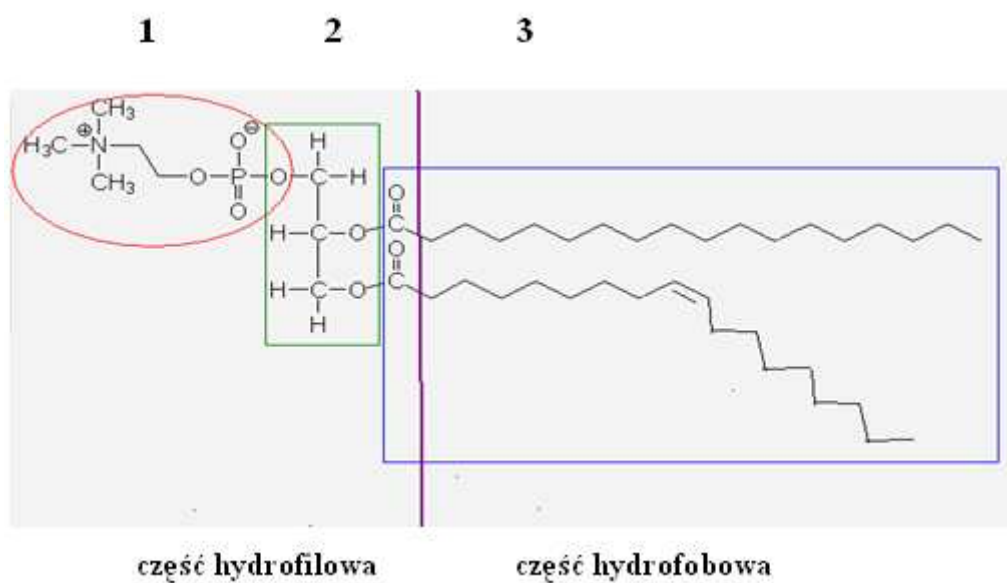
Załącznik 29. Zależność względnej anizotropii fluorescencji sondy TMA-DPH od stężenia berbersy, derenia, mahonii, ogórecznika, arniki, zielonej herbaty, cyjanidyny, cyjanidyno-3-galaktozydu, kwercetyny, kwercetyno-3-gaaktozydu, kwasu chlorogenowego, EGCG oraz epikatechiny.

Załącznik 30.

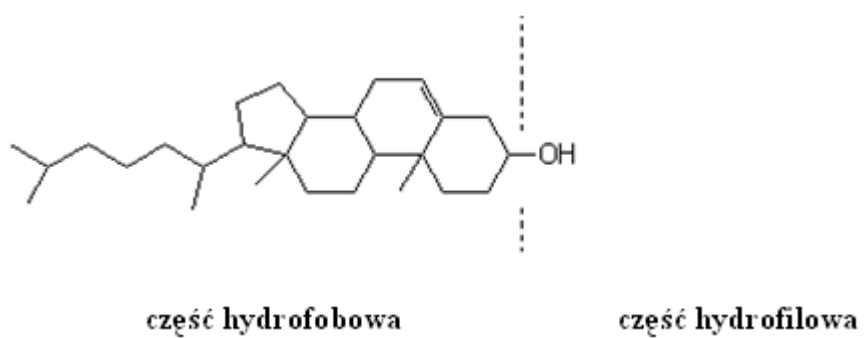
Procentowa efektywność zamykania przeciwutleniaczy w liposomach FAT-s. Zawartość cholesterolu w błonie liposomów wynosiła 40 mol %.

	DPPC	SD	DPPC + chol	SD	HSPC	SD	HSPC + chol	SD	EYPC	SD	EYPC + chol	SD
kwercetyna	53,78 c	1,18	13,51 d	1,01	38,55 a	1,19	14,67 a	1,06	3,83 d	0,29	45,94 a	1,86
EGCG	76,31 a	2,20	46,17 a	2,17	29,30 b	1,81	8,39 d	0,65	6,77 c	0,51	22,26 b	0,69
epikatechina	55,55 b	1,47	24,67 c	1,43	27,76 c	1,15	10,56 c	0,69	9,53 b	0,69	23,45 b	1,26
arnika	31,49 e	1,28	12,67 d	0,89	19,40 d	1,53	7,86 e	0,49	11,82 a	0,91	17,58 c	0,45
zielona herbata	33,29 d	0,64	29,75 b	1,35	12,27 e	0,94	11,70 b	0,63	3,30 d	0,18	5,66 d	0,40

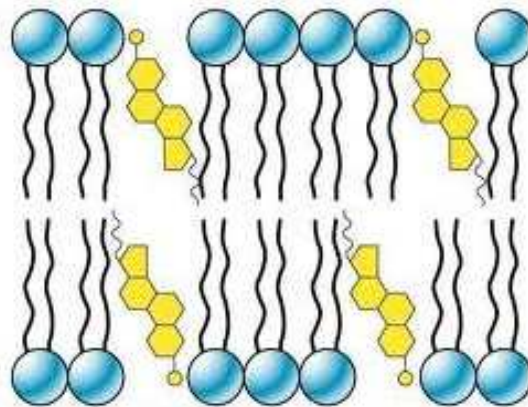
a, b, c – grupy jednorodne w analizie wariancji przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$



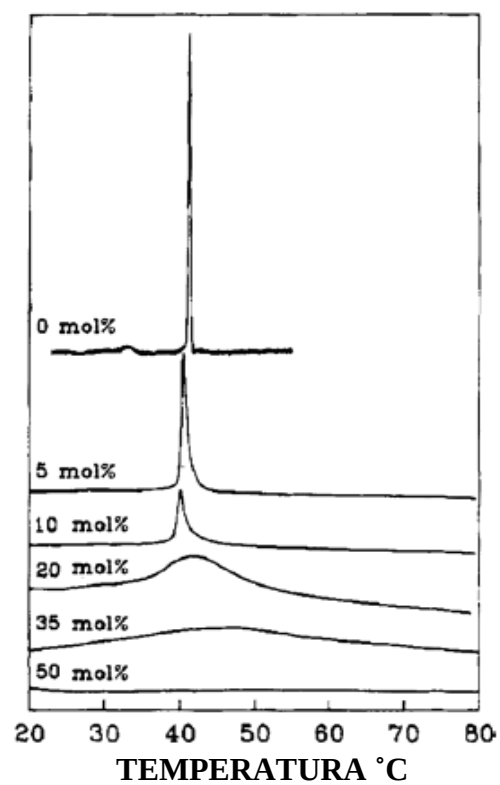
Rys. 1. Wzór strukturalny fosfatydylocholiny jako przykładu fosfolipidu [Stryer 2003]



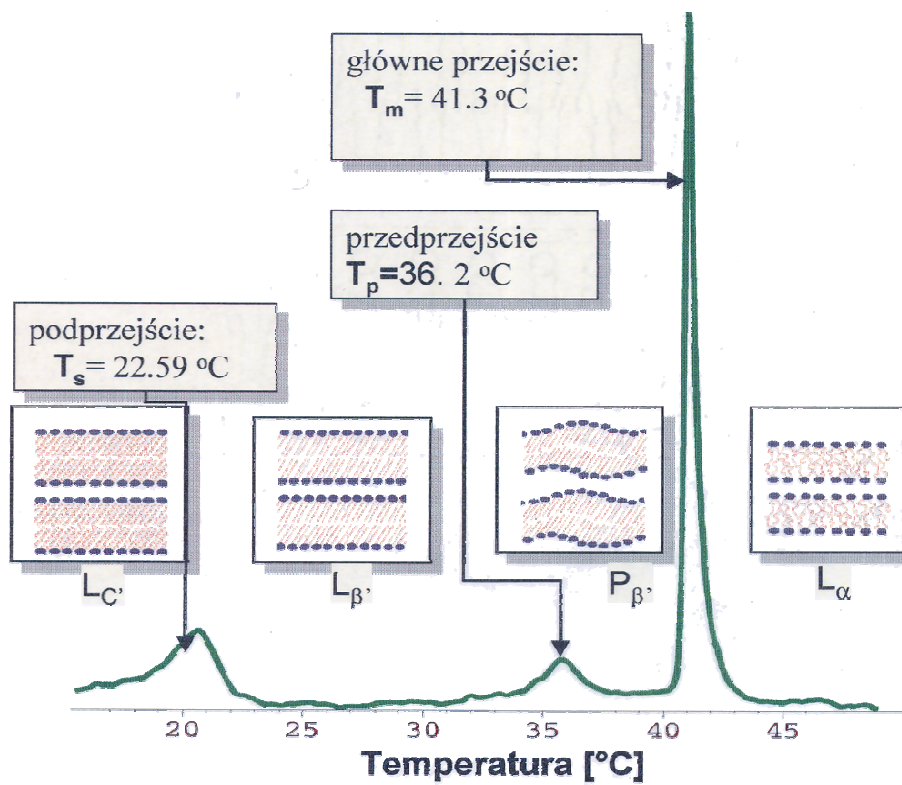
Rys. 2. Struktura cholesterolu



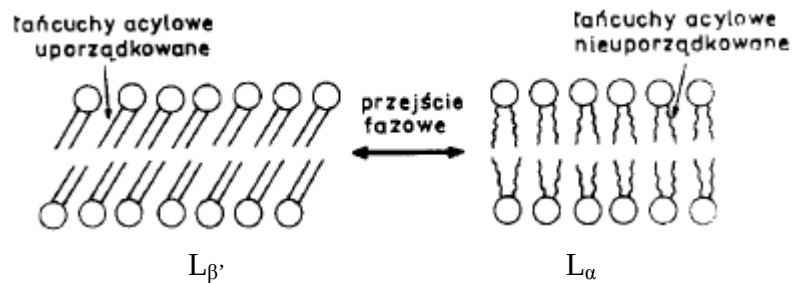
Rys. 3. Lokalizacja cholesterolu w błonie [Dołowy i wsp. 2003]



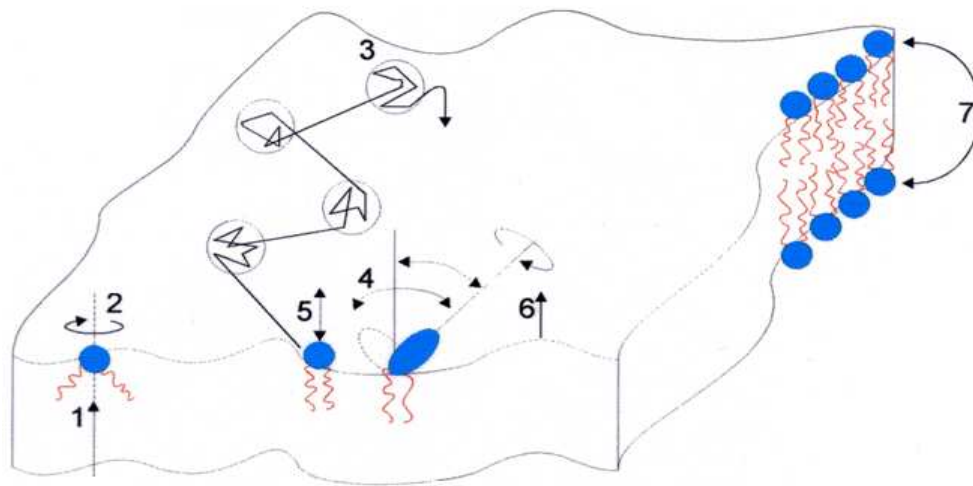
Rys. 4. Wpływ różnych ilości cholesterolu na termotropowe przejścia fazowe DPPC [Mannock i wsp. 2010]



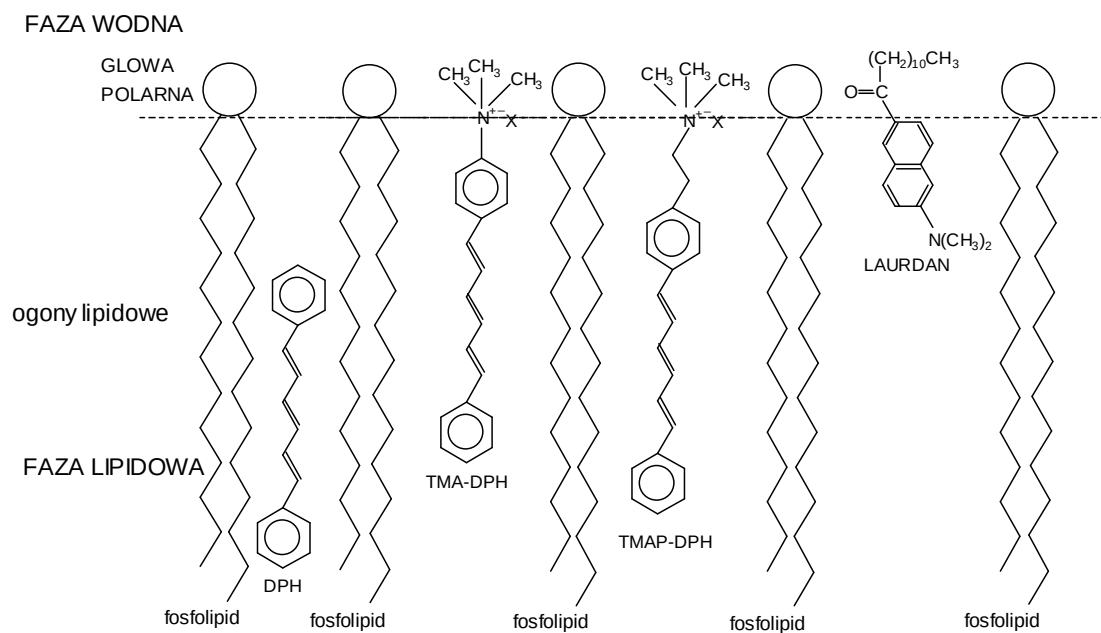
Rys. 5. Termogram DPPC – zmiany fazowe DPPC a odpowiadający im profil zmian w różnicowej kalorymetrii skaningowej [Seddon i Templer 1995]



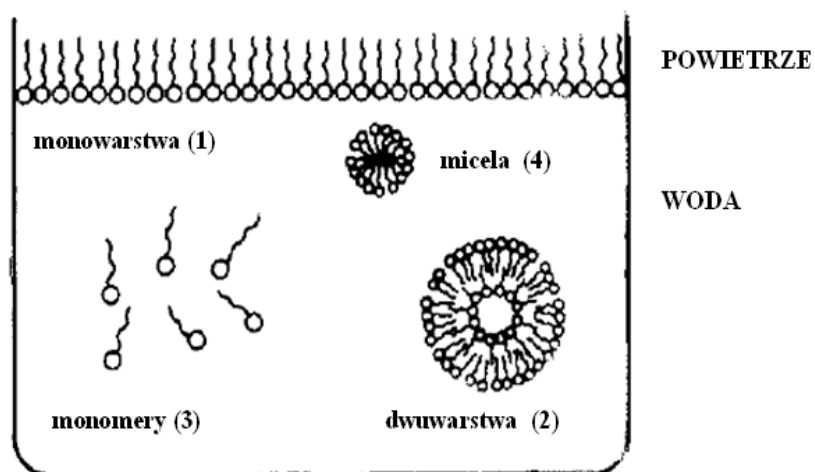
Rys. 6. Schematyczne przedstawienie struktur fazy krystalicznej i ciekłokrystalicznej [Kozubek i wsp. 1996]



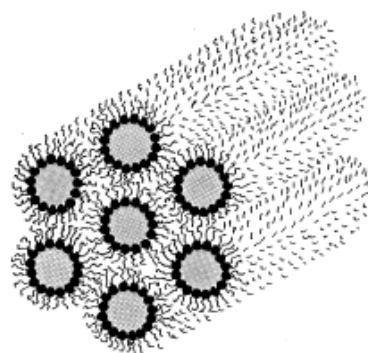
Rys. 7. Schemat możliwych ruchów cząsteczek lipidów w dwuwarstwie lipidowej:
 1 - ruchy łańcuchów węglowodorowych, 2 – ruch rotacyjny cząsteczki lipidowej,
 3 - ruchy dyfuzyjne cząsteczek na powierzchni dwuwarstwy, 4 – możliwe ruchy główki polarnej lipidów, 5 – drgania cząsteczek w kierunku prostopadłym do powierzchni dwuwarstwy, 6 – lokalne oscylacje dwuwarstwy, 7 – ruch „flip-flop” cząsteczek pomiędzy górną i dolną warstwę dwuwarstwy [Sackmann 1995, Gabrielska 2001]



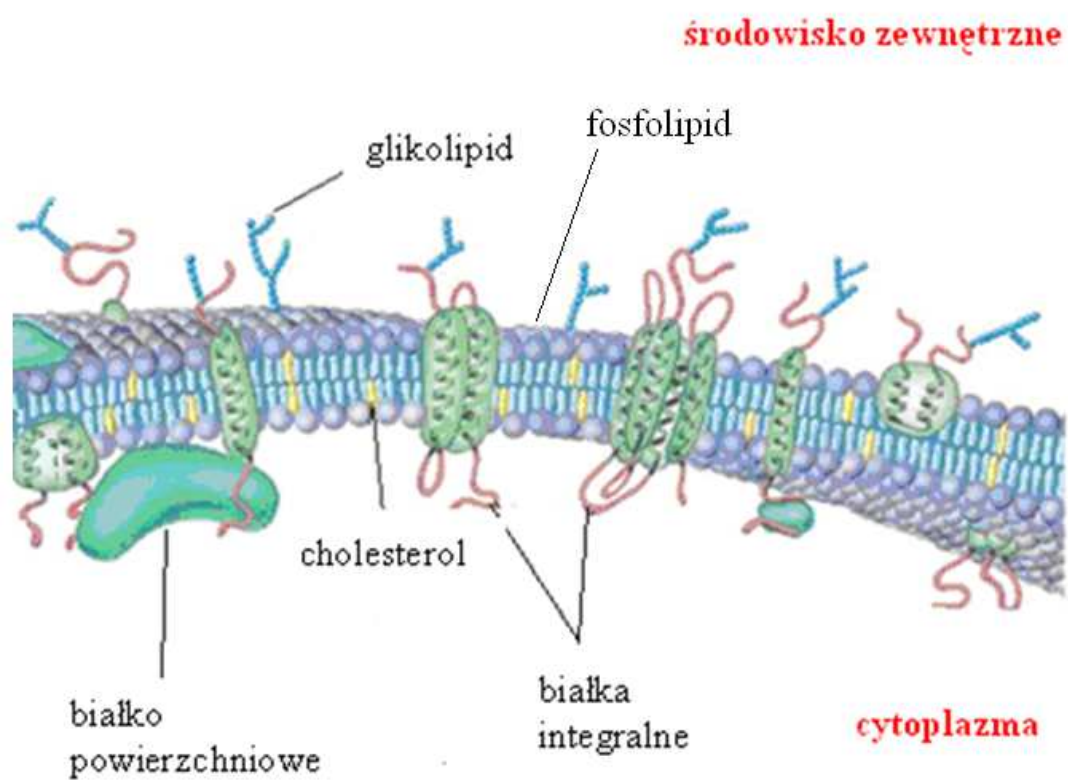
Rys. 8. Sondy fluorescencyjne DPH, TMA-DPH, TMAP-DPH i Laurdan i ich prawdopodobna lokalizacja w błonie lipidowej [Dumas i wsp.1997]



Rys. 9. Struktury agregacyjne lipidów [Kozubek i wsp. 1996]

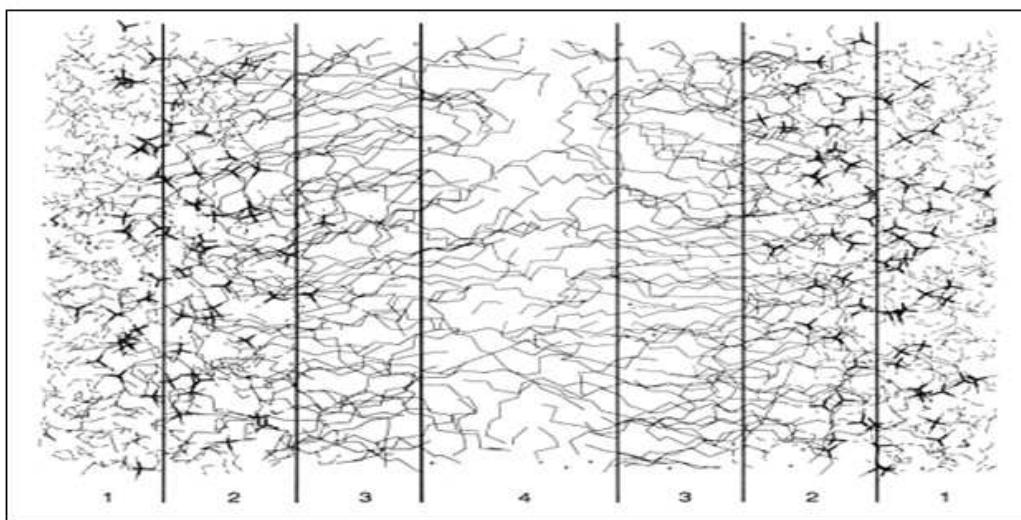


Rys. 10. Schemat odwróconej fazy heksagonalnej H_{II} [Seddon i Temper 1995]

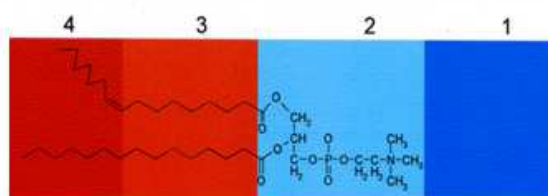


Rys. 11. Model błony biologicznej [Garrett i Grisham 2004]

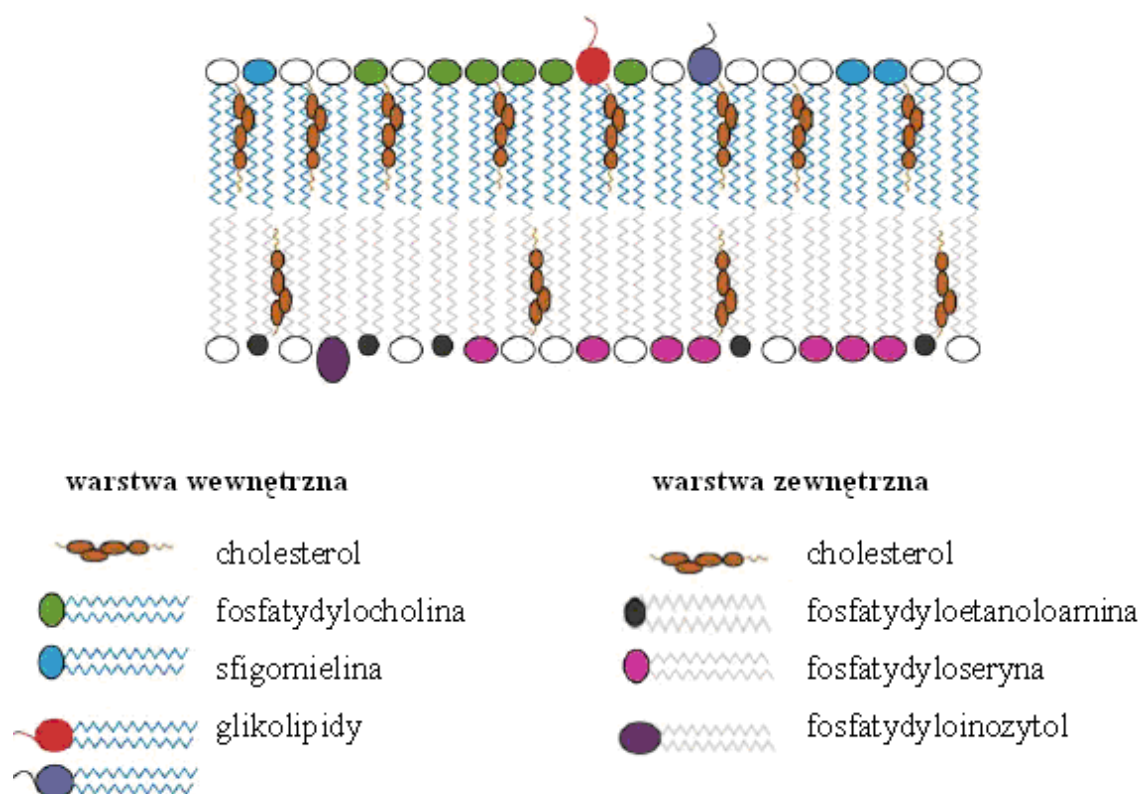
a)



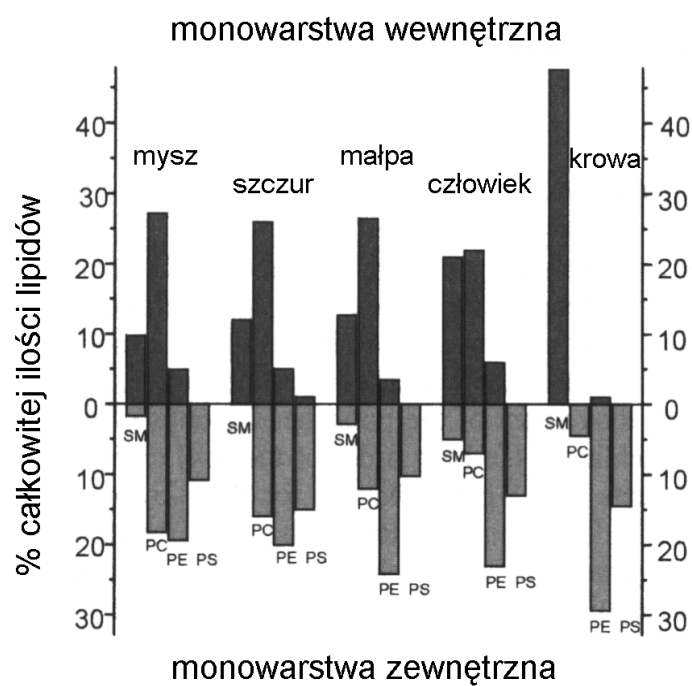
b)



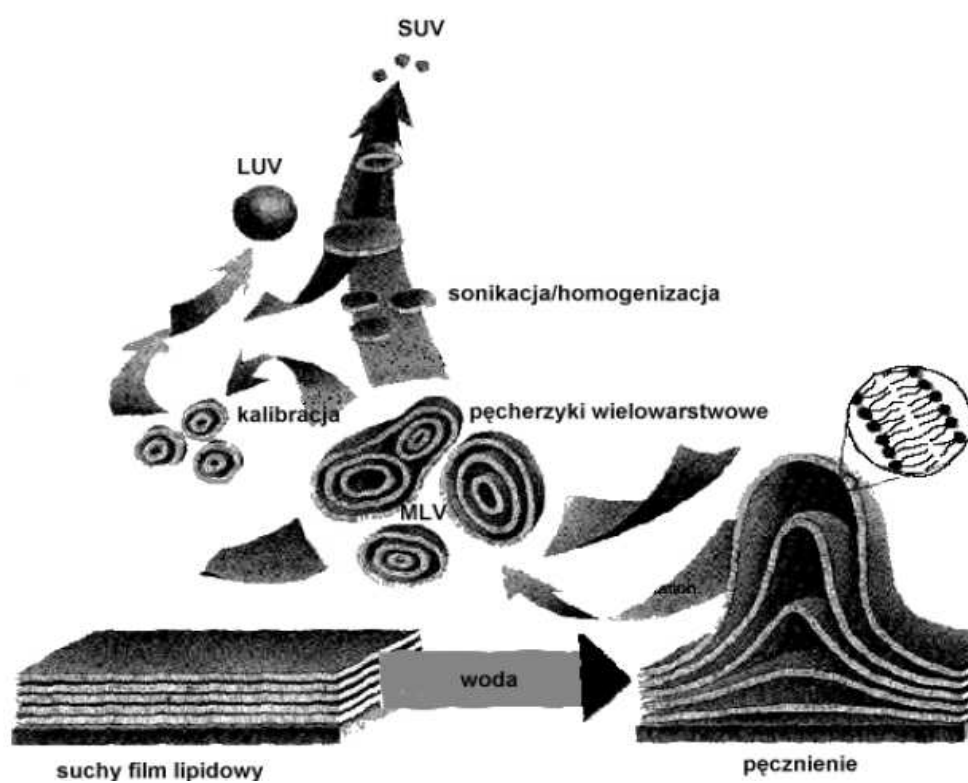
Rys. 12. a) Symulacja komputerowa czterostrefowego modelu dwuwarstwy lipidowej, b) czterostrefowy model błony na przykładzie cząsteczki fosfatydylocholiny: 1 - strefa perturbacji wody, 2 – międzyfazowa, 3 – miękkie polimery, 4 – strefa dekanu [Tieleman i wsp. 1997]



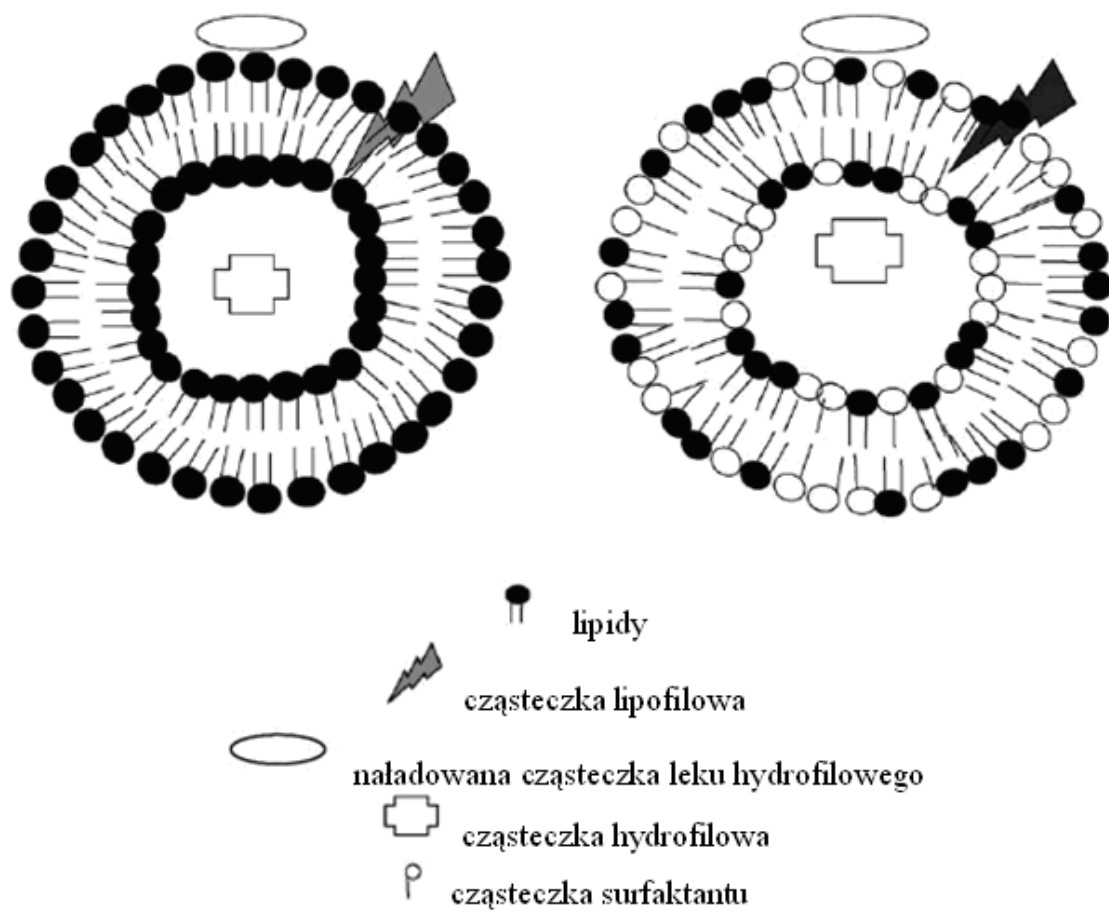
Rys. 13. Ogólny schemat asymetrii błon komórkowych [Janmey i Kinnunen 2006]



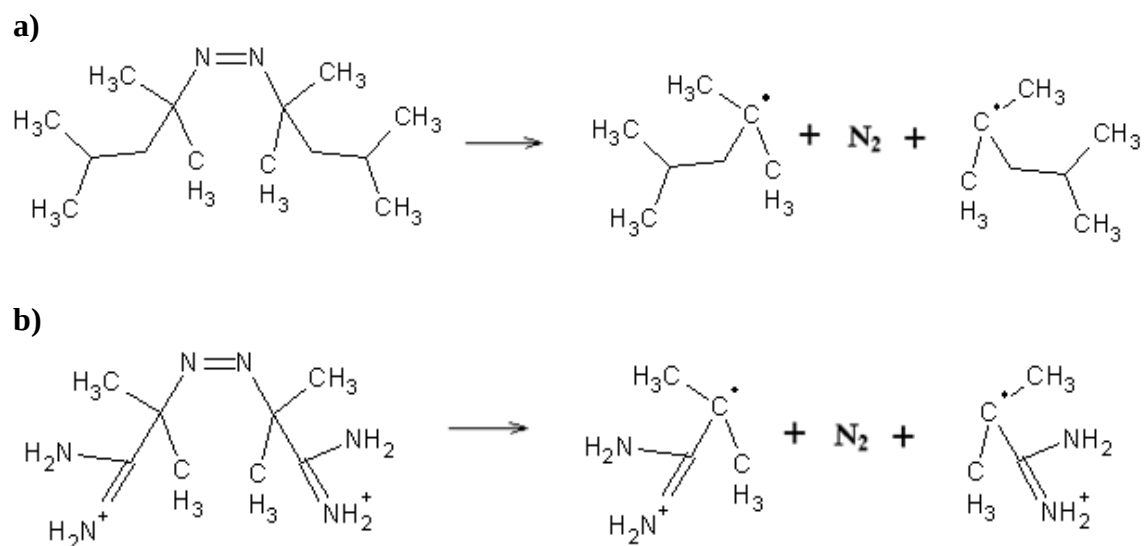
Rys. 14. Asymetria lipidów w erytrocytach różnych ssaków [Bernhardt i Ellory 2003]



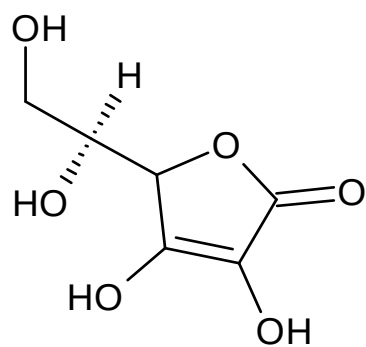
Rys. 15. Schemat przykładowych metod otrzymywania liposomów [Kozubek 2004]



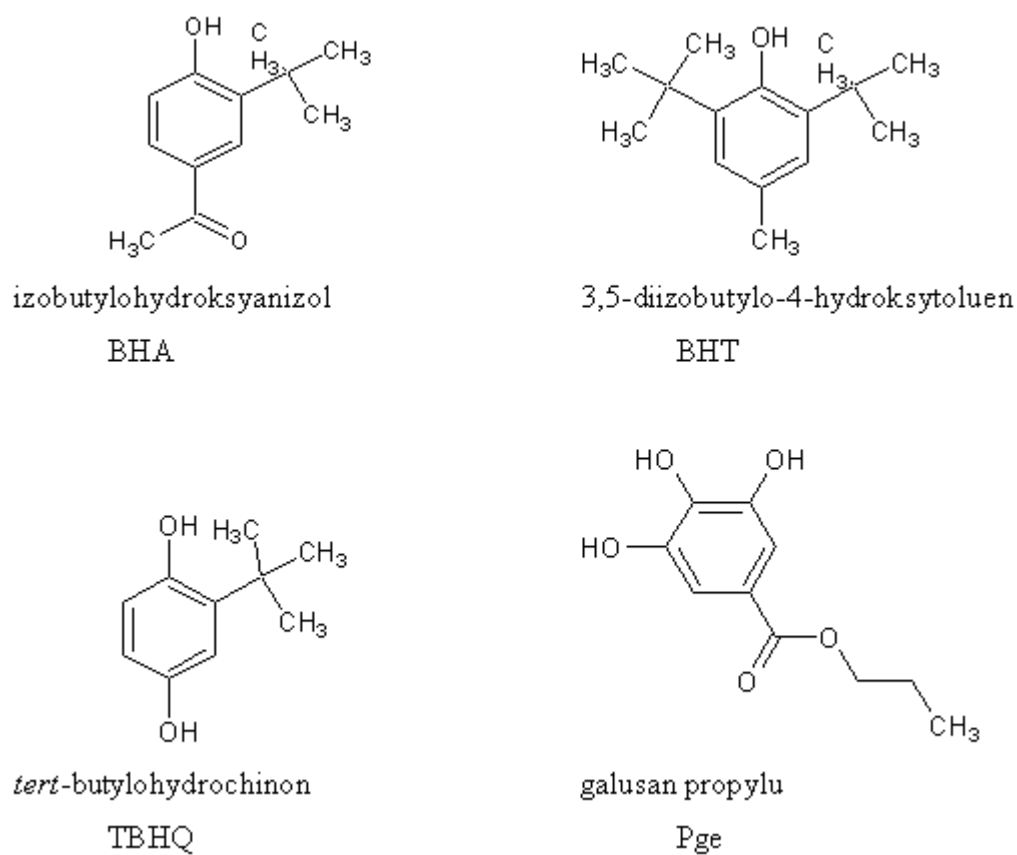
Rys. 16. Lokalizacja substancji zamykanych w liposomach [Honeywell-Nguyen i Bouwstra 2005]



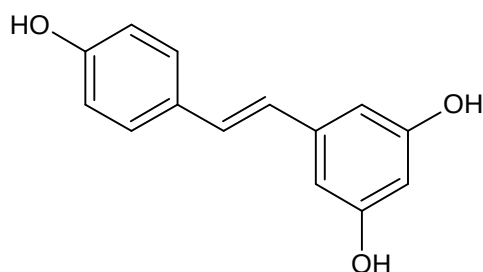
Rys. 17. Homolityczny rozpad: a) AAPH - 2,2'-azo-bis(2-amidynopropanu),
b) AMVN - 2,2'-azo-bis(2,4-dimetylowaleronitrylu) [Bartosz 2006, Halliwell
i Gutteridge 2007]



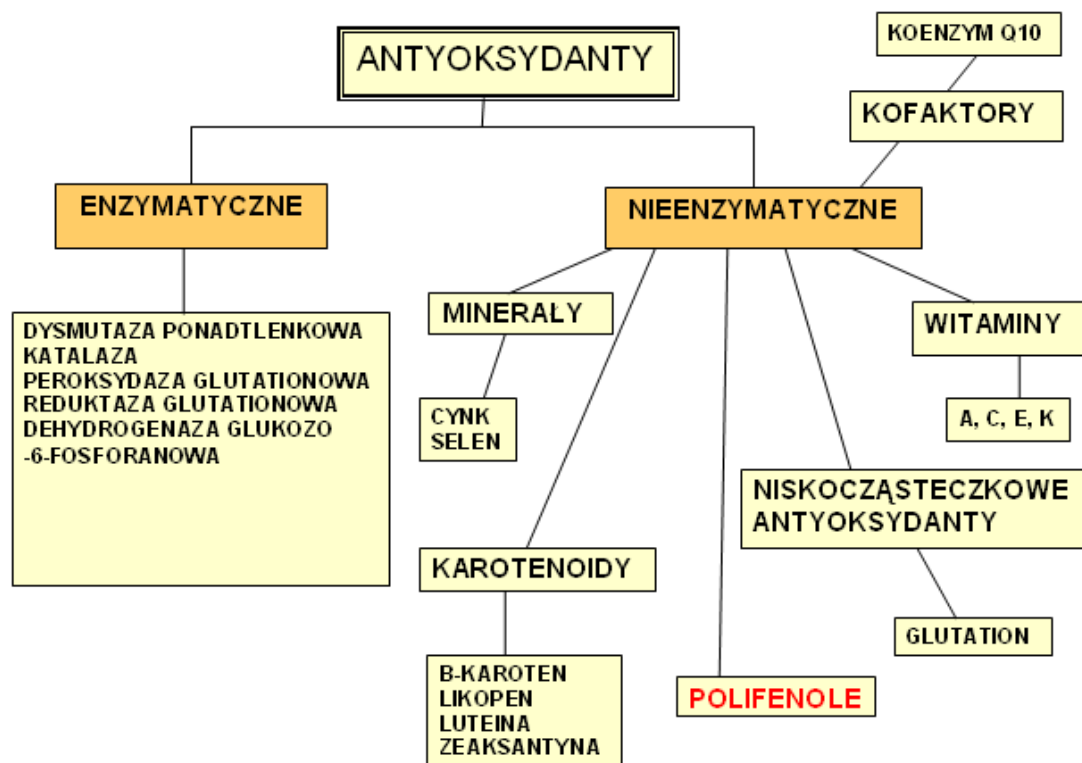
Rys. 18. Struktura kwasu askorbinowego (witamina C)



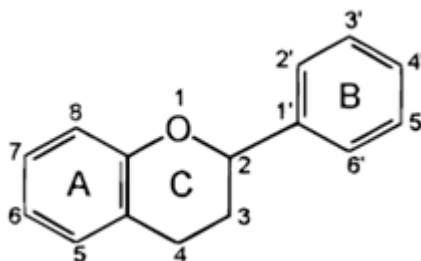
Rys. 19. Struktury cząsteczkowe przeciwutleniaczy stosowanych w przemyśle spożywczym [www.sigmaaldrich.com]



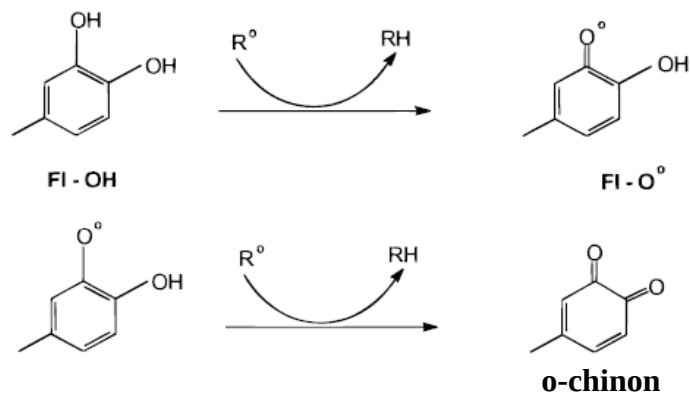
Rys. 20. Struktura resweratrolu [www.sigmaaldrich.com]



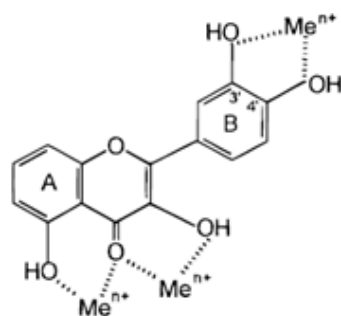
Rys. 21. Ogólny podział przeciwutleniaczy [Ratman i wsp. 2006]



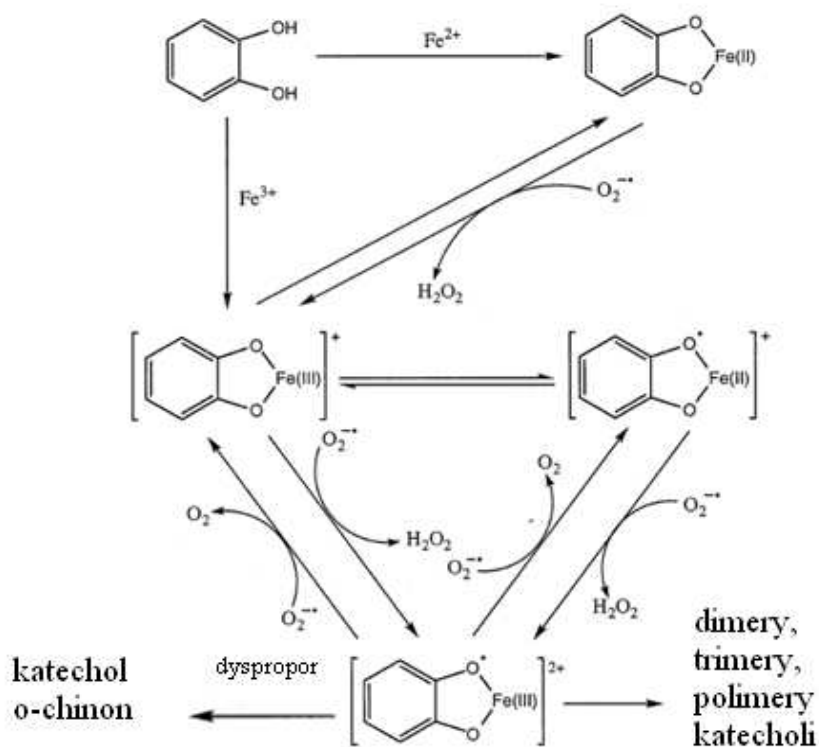
Rys. 22. Ogólna budowa cząsteczkowa flawonoidów



Rys. 23. Mechanizm wychwytywania wolnych rodników przez flawonoidy [Pietta 2000]

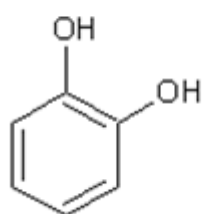


Rys. 24. Możliwe miejsca wiązania jonów metali przez cząsteczkę flawonoidu [Pietta 2000]

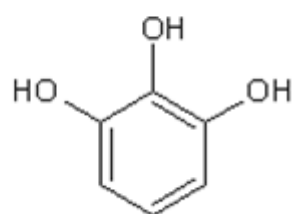


Rys. 25. Schemat mechanizmu wychwytywania rodnika nadtlenkowego przez kompleks grupy katecholowej z żelazem [Zhao i wsp. 1998]

a)



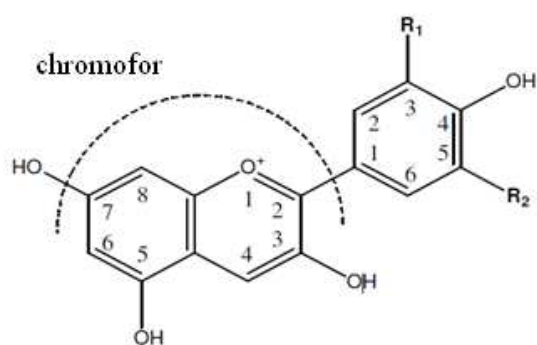
b)



Rys. 26. Struktury a) katecholu b) pirogalolu

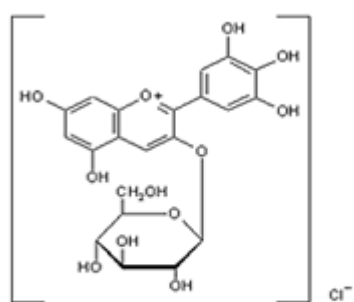


Rys. 27. Kwiaty i owoce berberysu pospolitego (*Berberis vulgaris* L.)
[www.biology.pl]

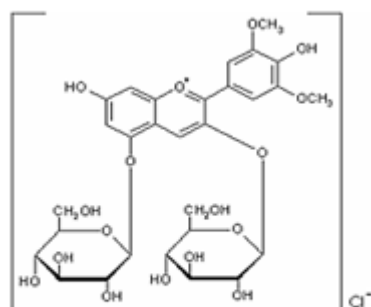


	R1	R2
delfinidyna	OH	OH
cyjanidyna	OH	H
pelargonidyna	H	H
peonidyna	OCH₃	H
petunidyna	OCH₃	OH
malwidyna	OCH₃	OCH₃

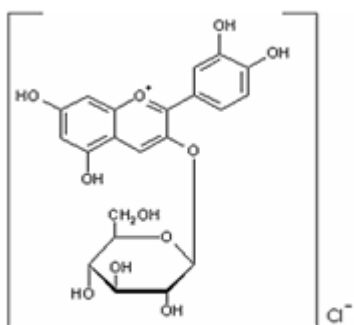
Rys. 28. Struktury chemiczne antocyjanów występujących w berberysie pospolitym.
[Wallace 2010]



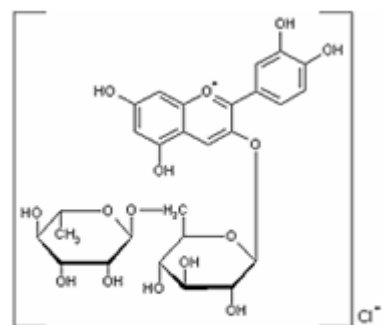
delfinidyno-3-glukozyd



malwidyno-3-glukozyd



cyjanidyno-3-glukozyd



cyjanidyno-3-rutynozyd

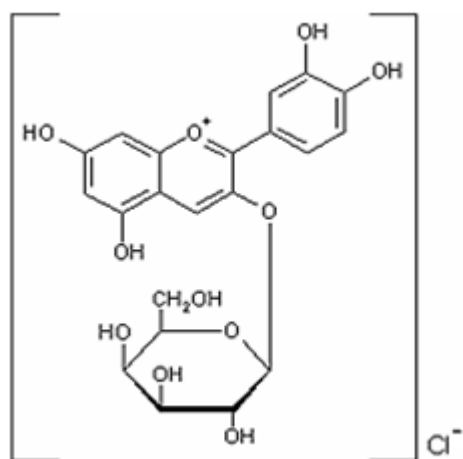
Rys. 29. Struktury antocyjanów obecnych w berberysie pospolitym [www.extrasynthese.com]



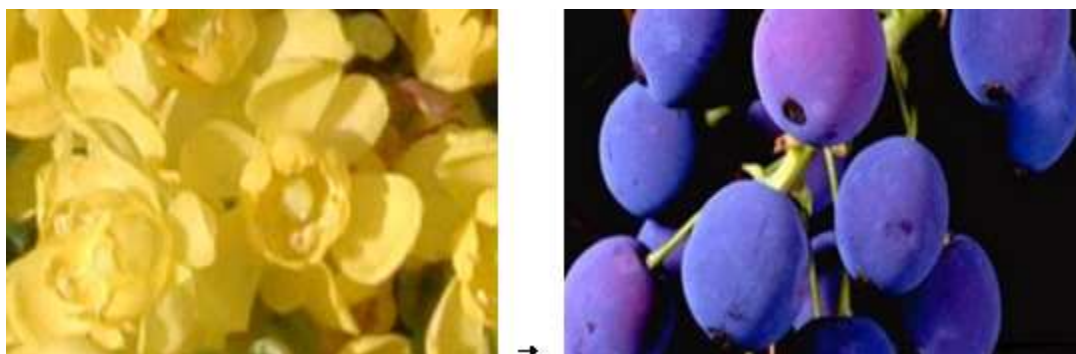
Rys. 30. Kwiaty derenia jadalnego (*Cornus mas* L.) [www.drzewa.nk4.netmark.pl]



Rys. 31. Owoce derenia jadalnego (*Cornus mas* L.) [www.biology.pl]



Rys. 32. Struktura cyjanidyno-3-galaktozydu - przykład antocyjanu zawartego w dereniu jadalnym [www.extrasynthese.com]



Rys. 33. Kwiaty i owoce mahonii ostrolistnej (*Mahonia aquifolium*) [www.krzewy.pl]



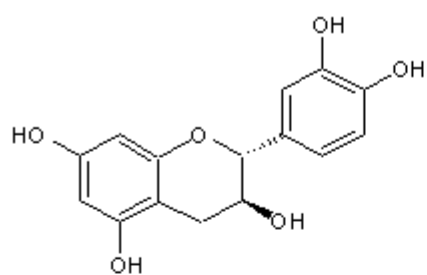
Rys. 34. Ogórecznik lekarski (*Borago officinalis*) [www.swiatkwiatow.pl]



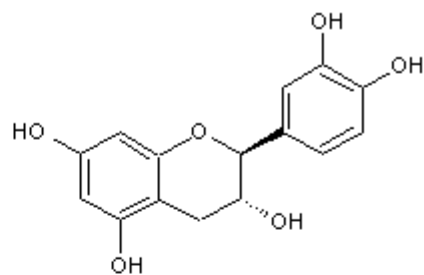
Rys. 35. Ziele arniki górskiej (*Arnica montana*) [www.arnika.net4.pl/]



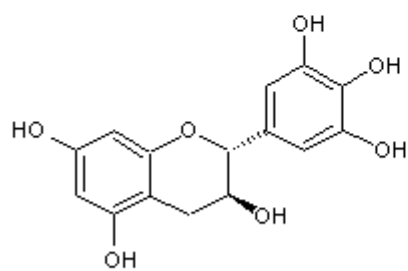
Rys. 36. Liście zielonej herbaty (*Camellia sinensis*) [www.skladherbaty.info]



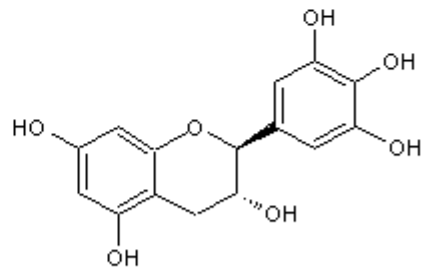
(+)-catechina



(-)-catechina

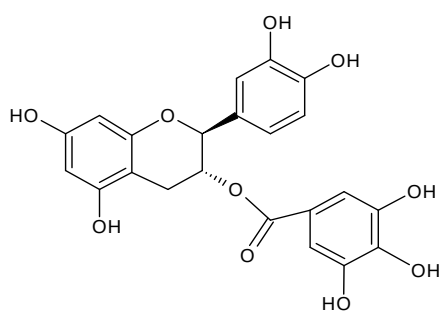


(+)-galokatechina

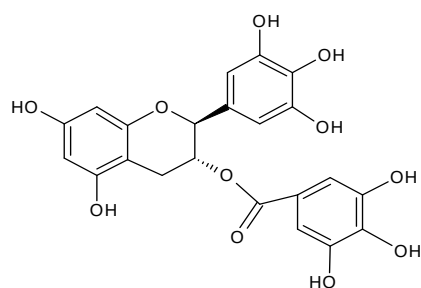


(-)-galokatechina

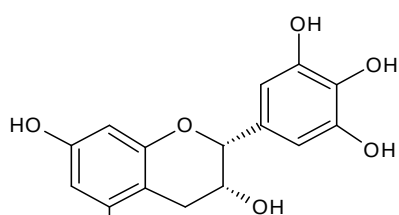
Rys. 37. Struktury wybranych katechin obecnych w zielonej herbacie



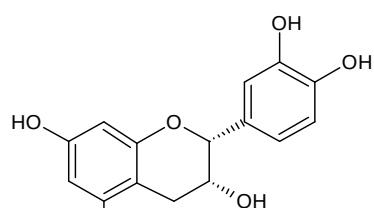
galusan (-)-katechiny



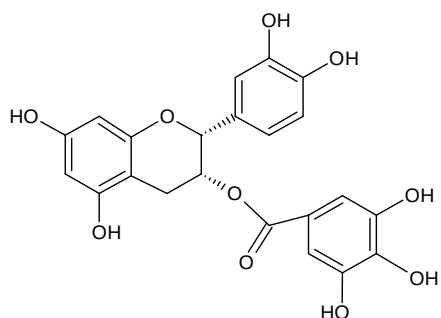
galusan (-)-galokatechiny



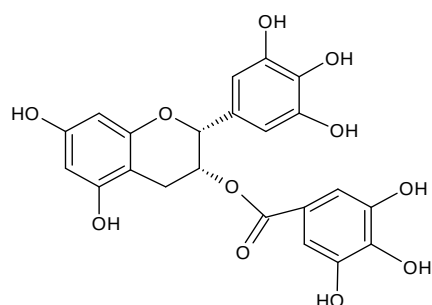
(-)-epigalokatechina



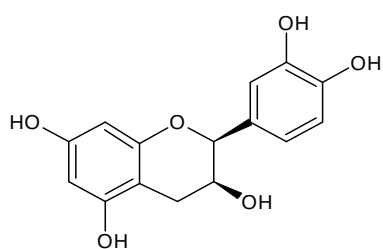
(-)-epikatechina



galusan (-)-epikatechiny

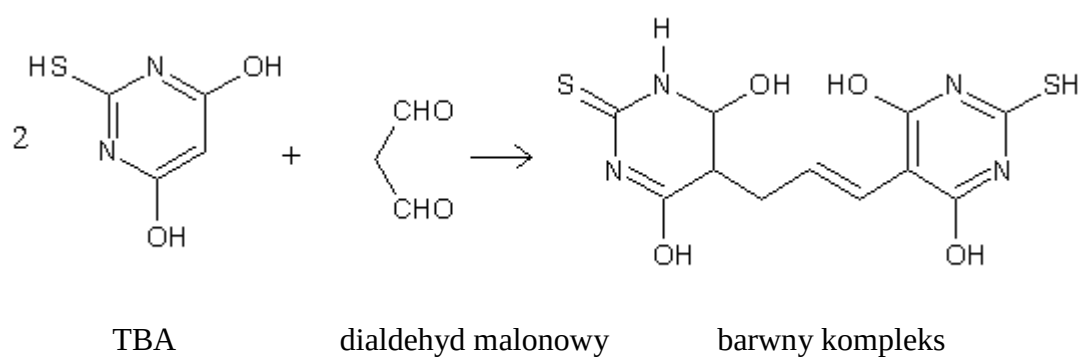


galusan (-)-epigalokatechiny

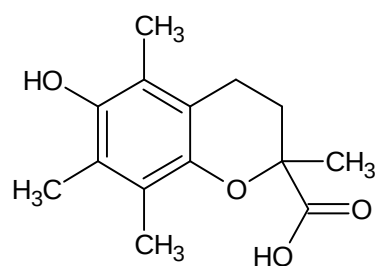


(+)-epikatechina

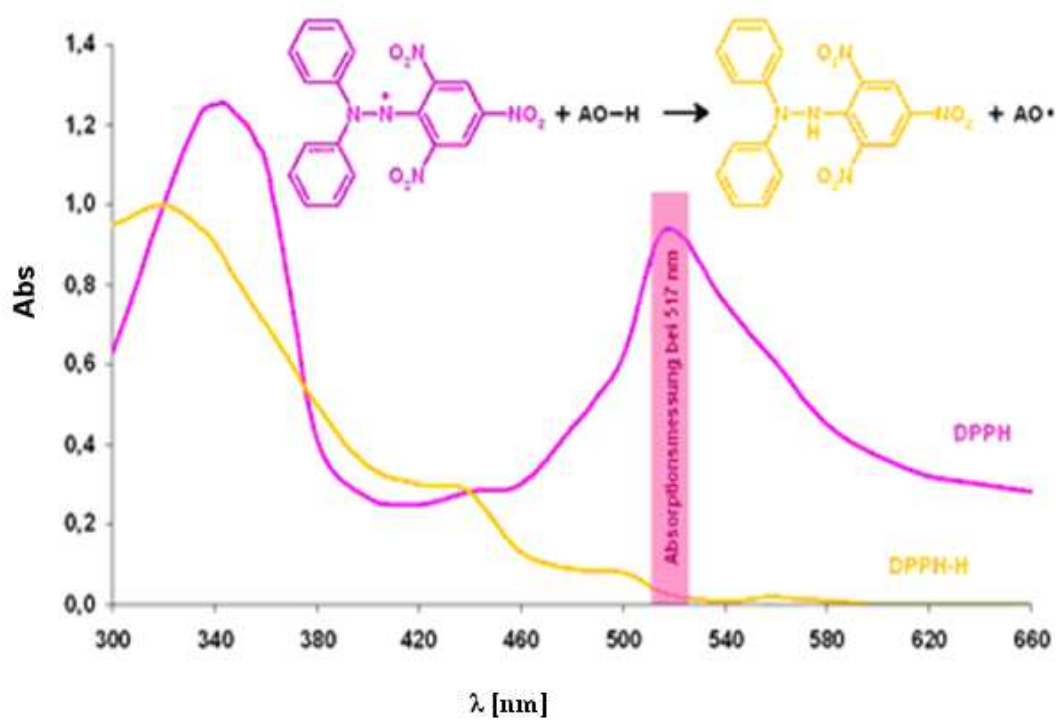
Rys. 38. Struktury wybranych katechin obecnych w zielonej herbacie



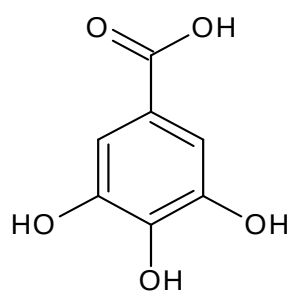
Rys. 39. Reakcja dialdehydu malonowego z kwasem tiobarbiturowym (TBA) [Buege i Aust 1978, Polanowski 2007]



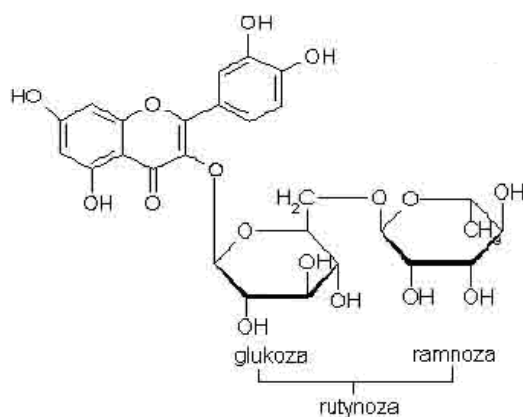
Rys. 40. Struktura chemiczna Troloksu



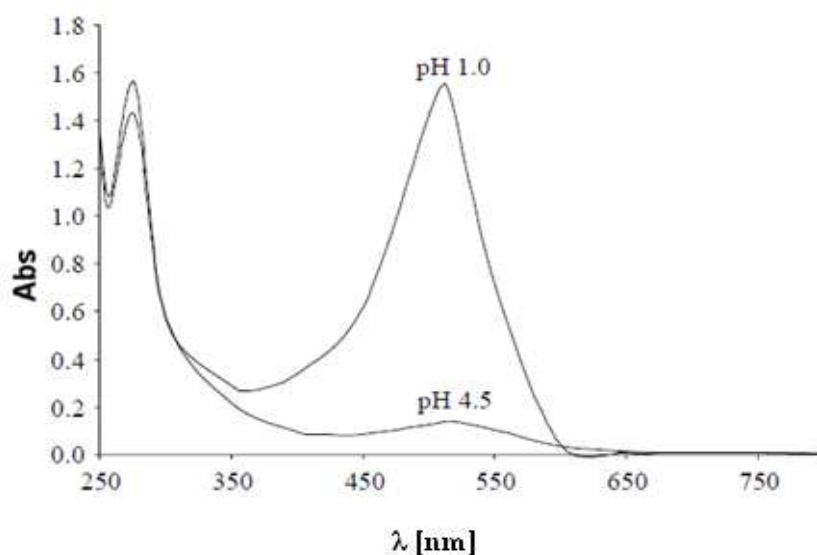
Rys. 41. Struktura rodnika DPPH• oraz schemat jego redukcji w obecności przeciwutleniacza [<http://www.baltic-analytics.de>]



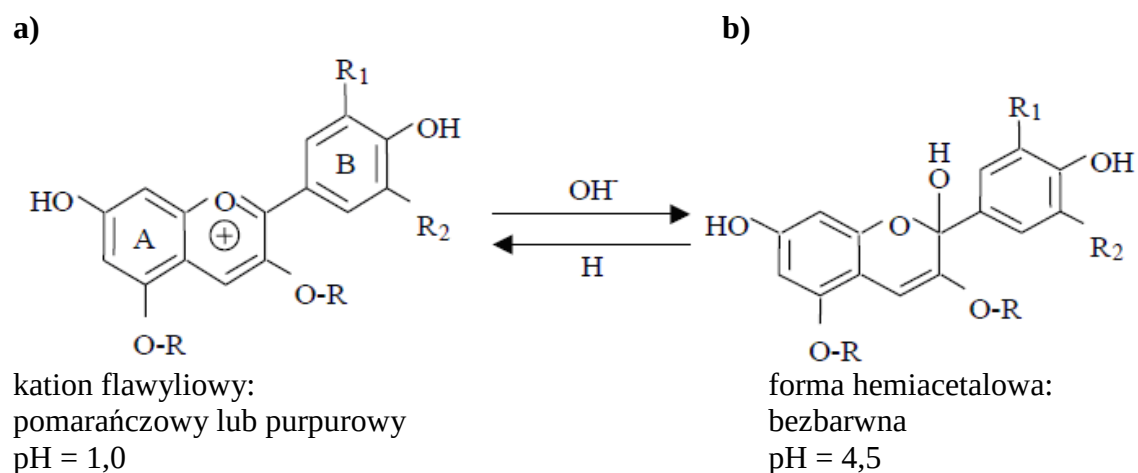
Rys. 42. Struktura kwasu galusowego



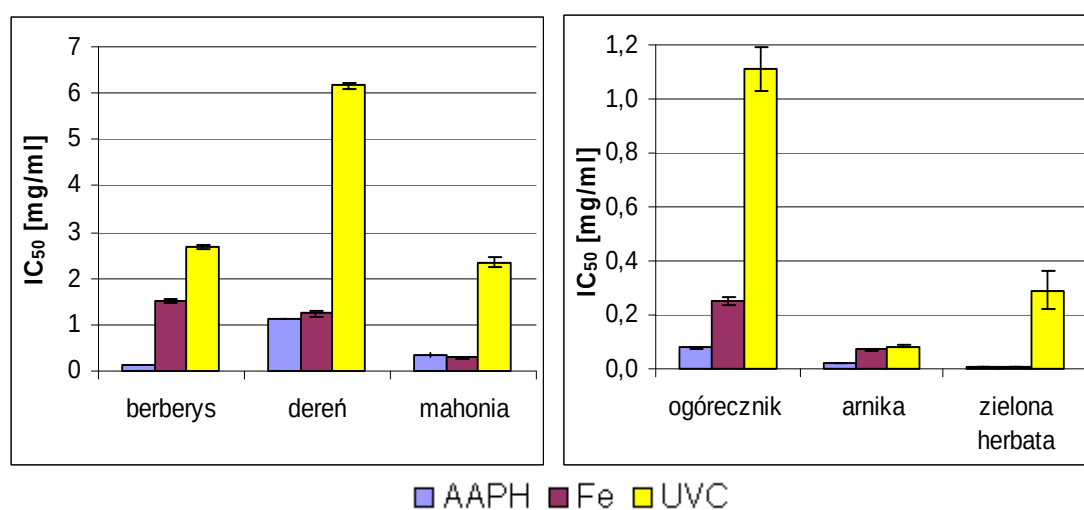
Rys. 43. Struktura rutyny [http://www.pfm.pl]



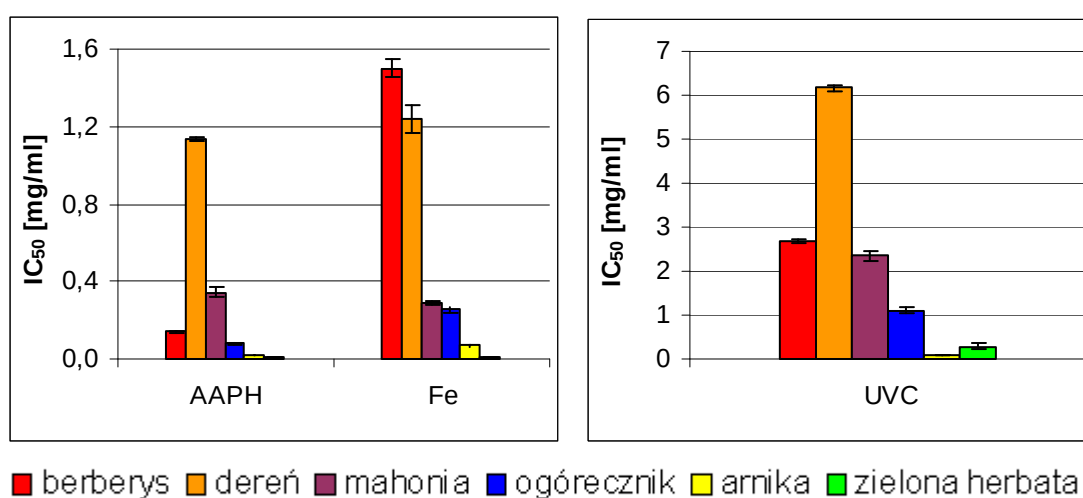
Rys. 44. Widmo UV antocyjanów w buforze o pH=1,0 i pH=4,5 [Wrolstad i wsp. 2005]



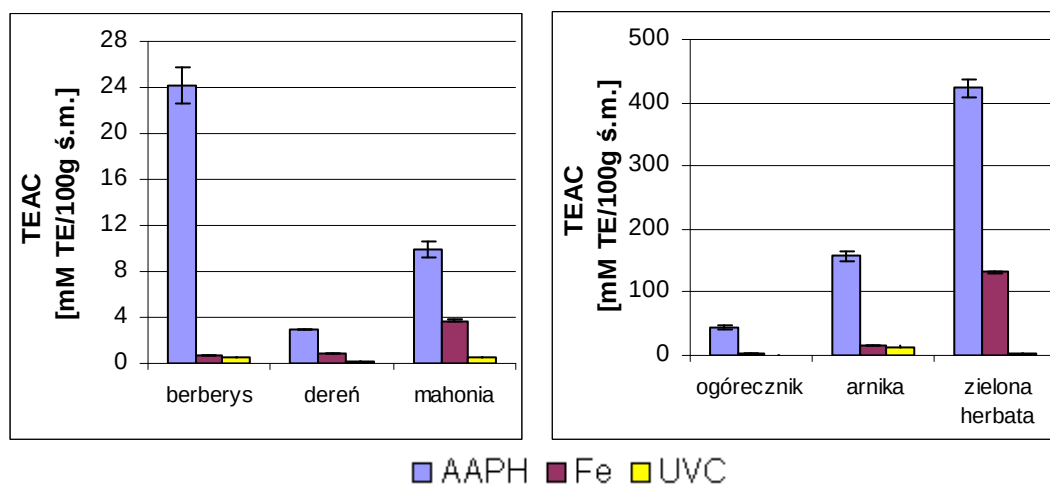
Rys. 45. Struktura kationu flawyliowego (A) i formy hemiacetalowej (B). R= H lub podstawnik cukrowy [Wrolstad i wsp. 2005]



Rys. 46a. Wartości parametrów IC₅₀ [mg/ml] ekstraktów polifenolowych wyznaczone w teście TBARS. Liposomy uformowane z EYPC uzyskano według procedury 4.4.1a. Utleniania indukowano trzema czynnikami: związkiem AAPH, jonami Fe²⁺/askorbinian (1:5, m/m) oraz promieniowaniem UVC. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało ± 8 %. Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 7a.

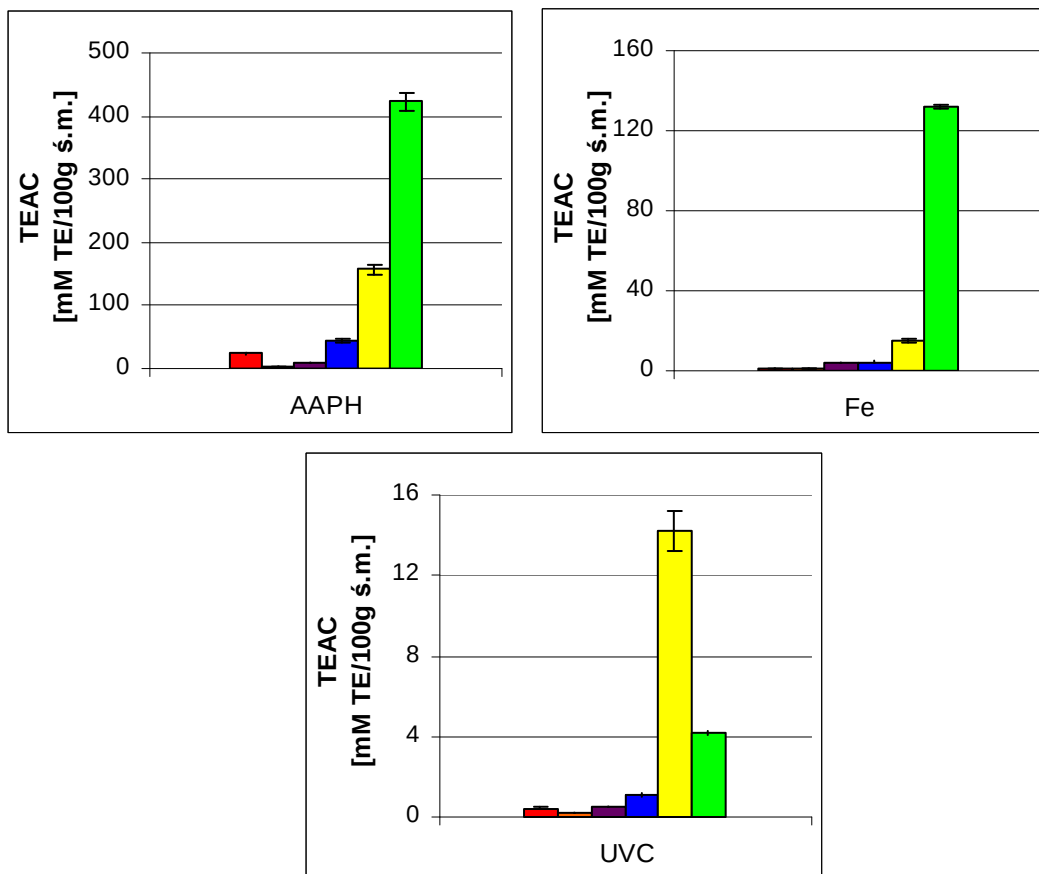


Rys. 46b. Wartości parametrów IC₅₀ [mg/ml] ekstraktów polifenolowych wyznaczone w teście TBARS. Liposomy uformowane z EYPC uzyskano według procedury 4.4.1a. Utleniania indukowano trzema czynnikami: związkiem AAPH, jonami Fe²⁺/askorbinian (1:5, m/m) oraz promieniowaniem UVC. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało ± 8 %. Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 7b.



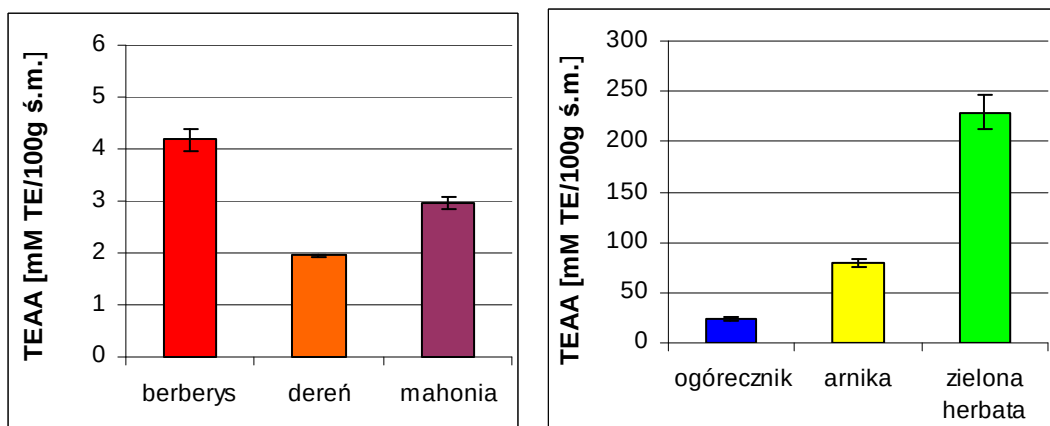
Rys. 47a. Wartości parametrów TEAC (ang. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) [mM TE/100g ś.m.] badanych ekstraktów wyznaczone w teście TBARS. Liposomy uformowane z EYPC uzyskano według procedury 4.4.1a. Utleniania indukowano trzema czynnikami: związkiem AAPH, jonami Fe^{2+} /askorbinian (1:5, m/m) oraz promieniowaniem UVC. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 8\%$.

Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 8a.

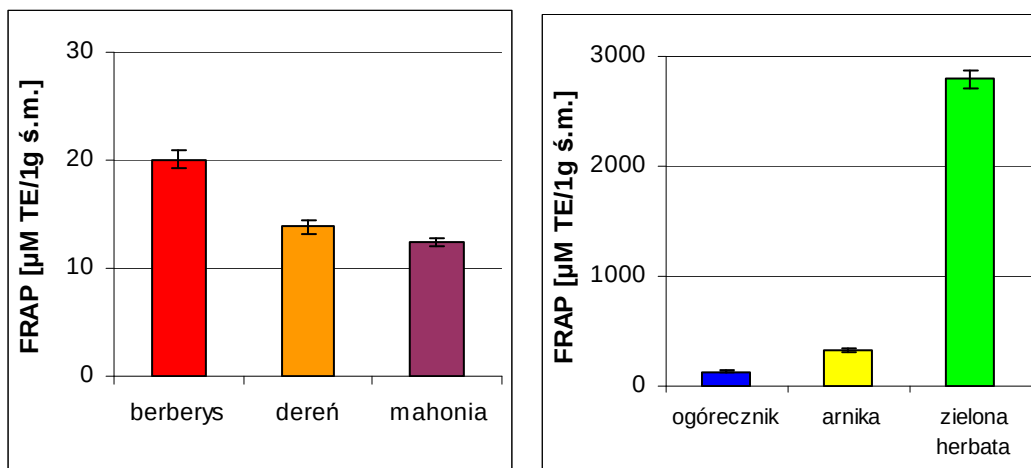


■ berberys ■ dereń ■ mahonia ■ ogórecznik ■ arnika ■ zielona herbata

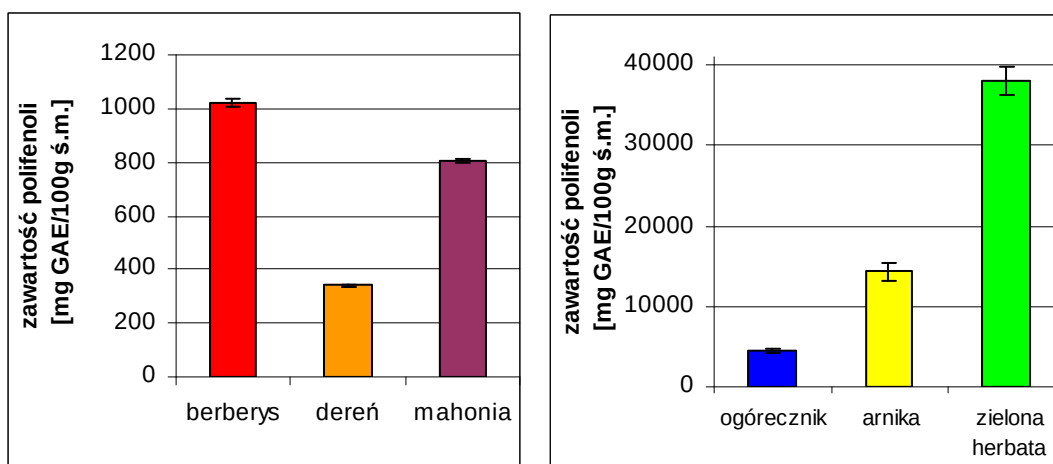
Rys. 47b. Wartości parametrów TEAC (ang. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) [mM TE/100g s.m.] badanych ekstraktów wyznaczone w teście TBARS. Liposomy uformowane z EYPC uzyskano według procedury 4.4.1a. Utleniania indukowano trzema czynnikami: związkiem AAPH, jonami Fe^{2+} /askorbinian (1:5, m/m) oraz promieniowaniem UVC. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 8\%$. Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 8b.



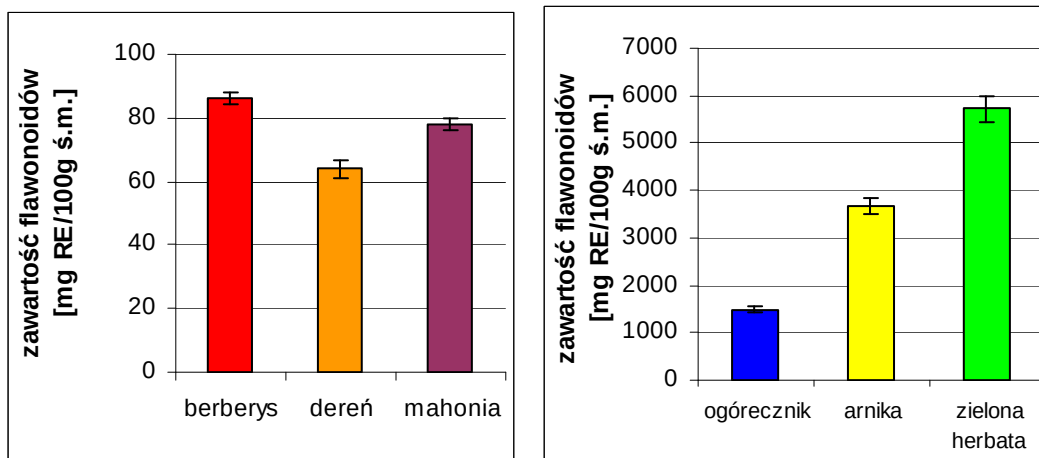
Rys. 48. Wartości parametrów TEAA (ang. Trolox Equivalent Antioxidant Activity) [mM TE/100 g s.m.] badanych ekstraktów. Właściwości przeciwrodnikowe badano wobec wolnego rodnika DPPH $\cdot$ według procedury 4.4.4. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 8\%$. Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 9.



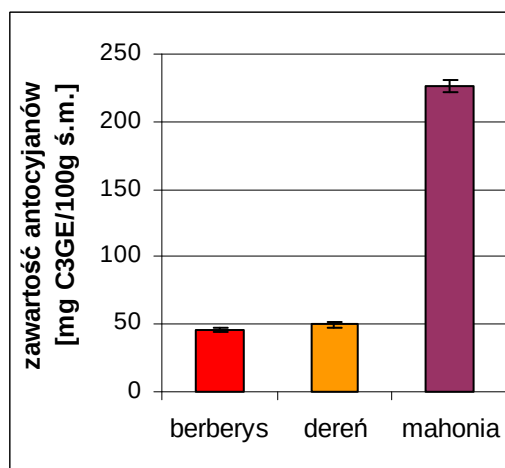
Rys. 49. Wartości parametrów FRAP (ang. Ferric Reducing Antioxidant Power) [μM TE/1 g ś.m.] badanych ekstraktów. Oznaczanie zdolności do redukowania jonów żelaza ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) wykonywano według procedury 4.4.5. Wartości otrzymano z pięciu niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 5\%$. Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 9.



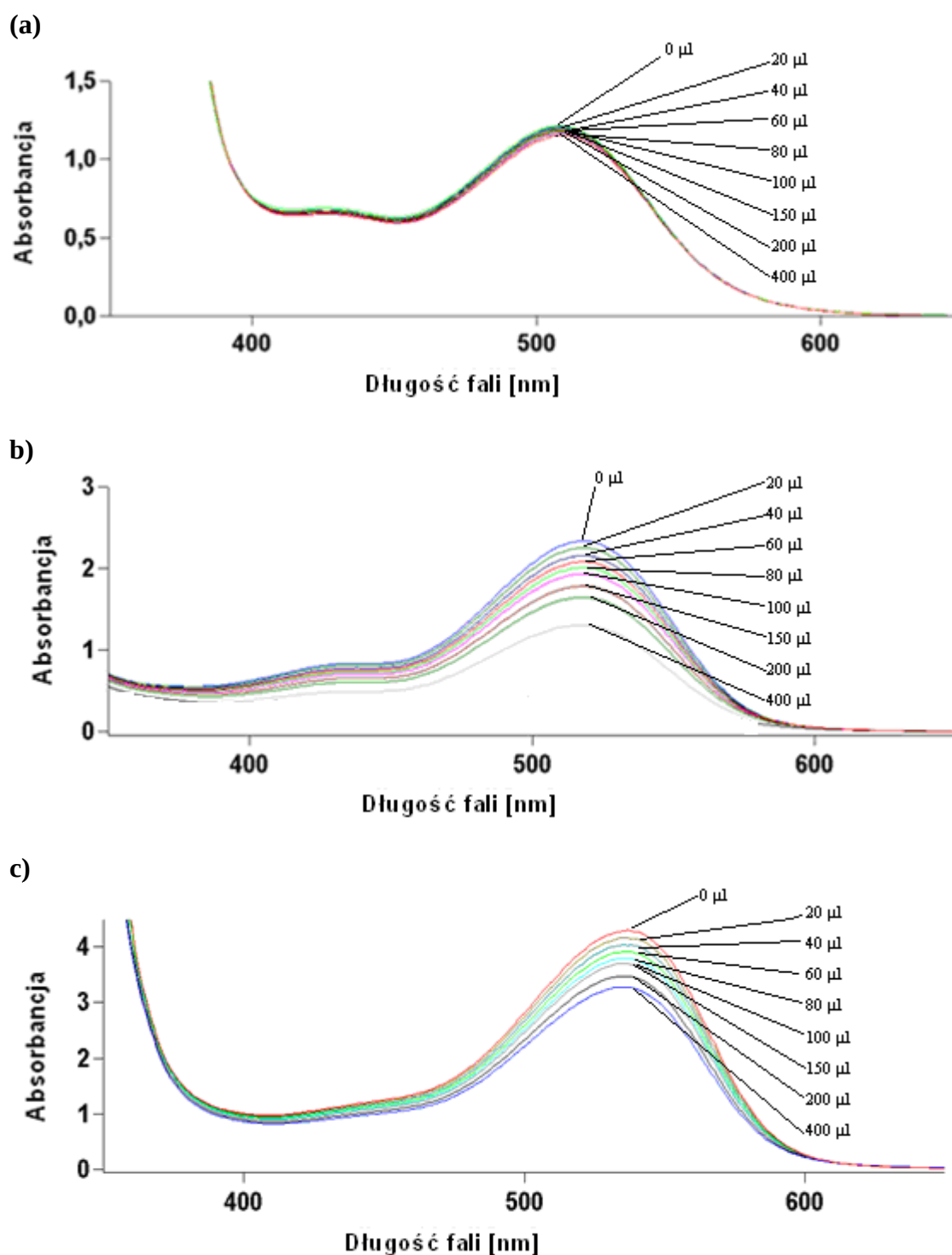
Rys. 50. Zawartość polifenoli [mg GAE/100g ś.m.] w ekstraktach roślinnych. Oznaczanie wykonywano według procedury opisanej w rozdziale 4.4.6. Wartości otrzymano z pięciu niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 8\%$. Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 10.



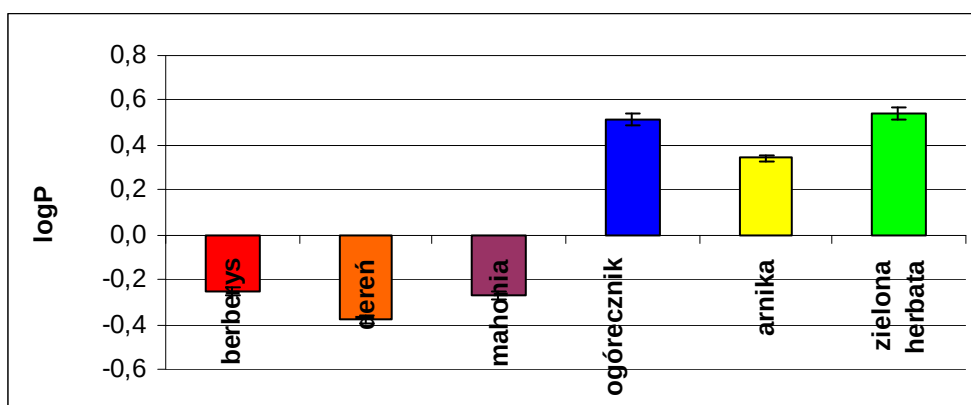
Rys. 51. Zawartość flawonoidów [mg RE/100g ś.m.] w ekstraktach roślinnych. Oznaczanie wykonywano według procedury opisanej w rozdziale 4.4.7. Wartości otrzymano z pięciu niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 5\%$. Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 10.



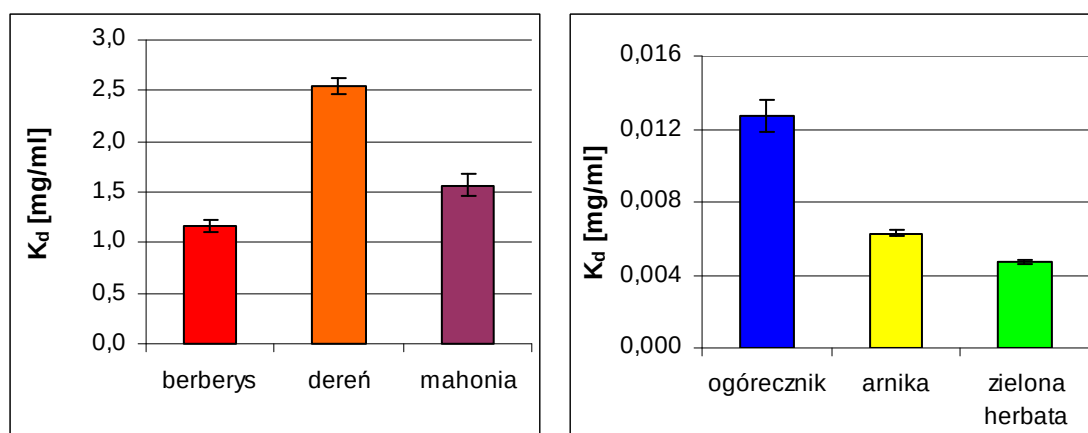
Rys. 52. Zawartość antocyjanów [mg cyj-3-gal/100g ś.m.] w ekstraktach roślinnych. Oznaczanie wykonywano według procedury opisanej w rozdziale 4.4.8. Wartości otrzymano z pięciu niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 5\%$. Wykres sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 10.



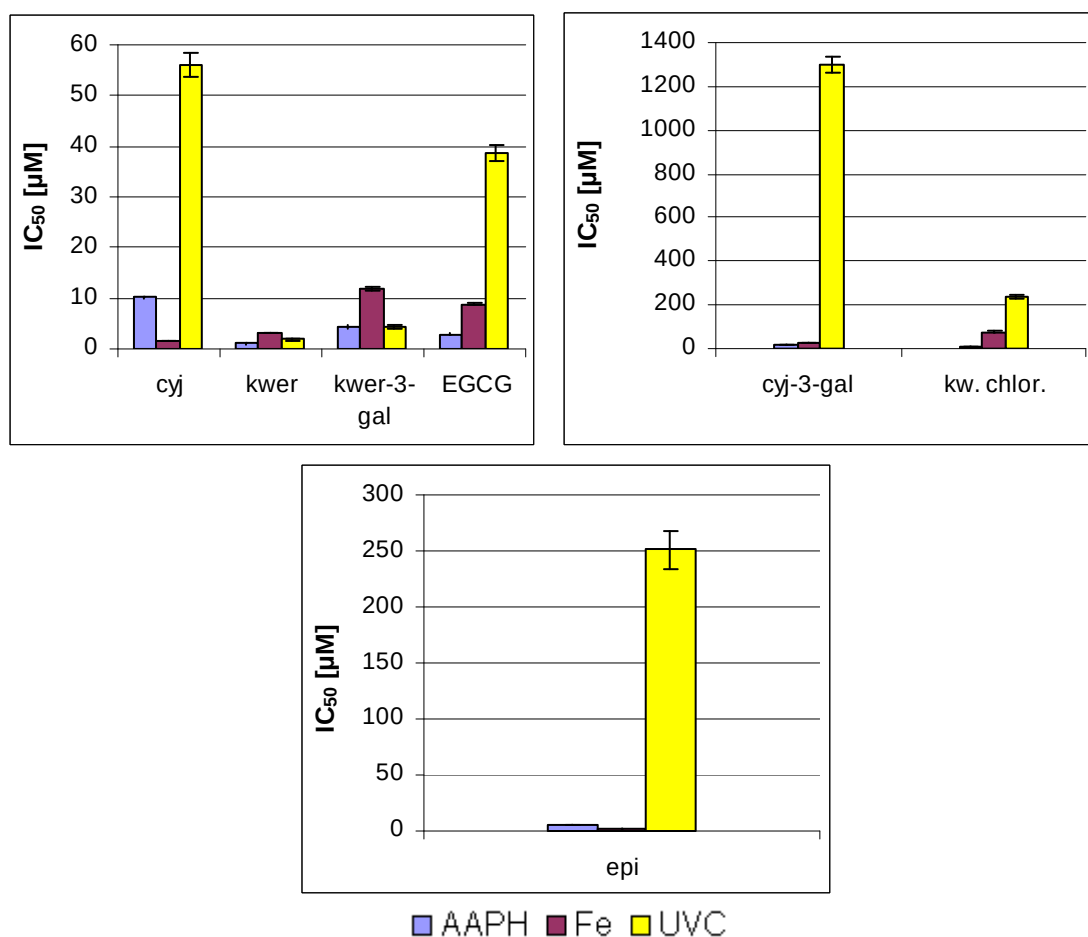
Rys. 53. Widma absorpcyjne UV-Vis (a) berberysu, (b) derenia oraz (c) mahonii miareczkowanych 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 i 400 μl 2 mM roztworu FeCl_2 . Stężenie początkowe ekstraktów wynosiło 0,03 g/ml natomiast końcowe wynosiło 0,025 g/ml. Oznaczanie wykonywano według procedury opisanej w rozdziale 4.4.9.



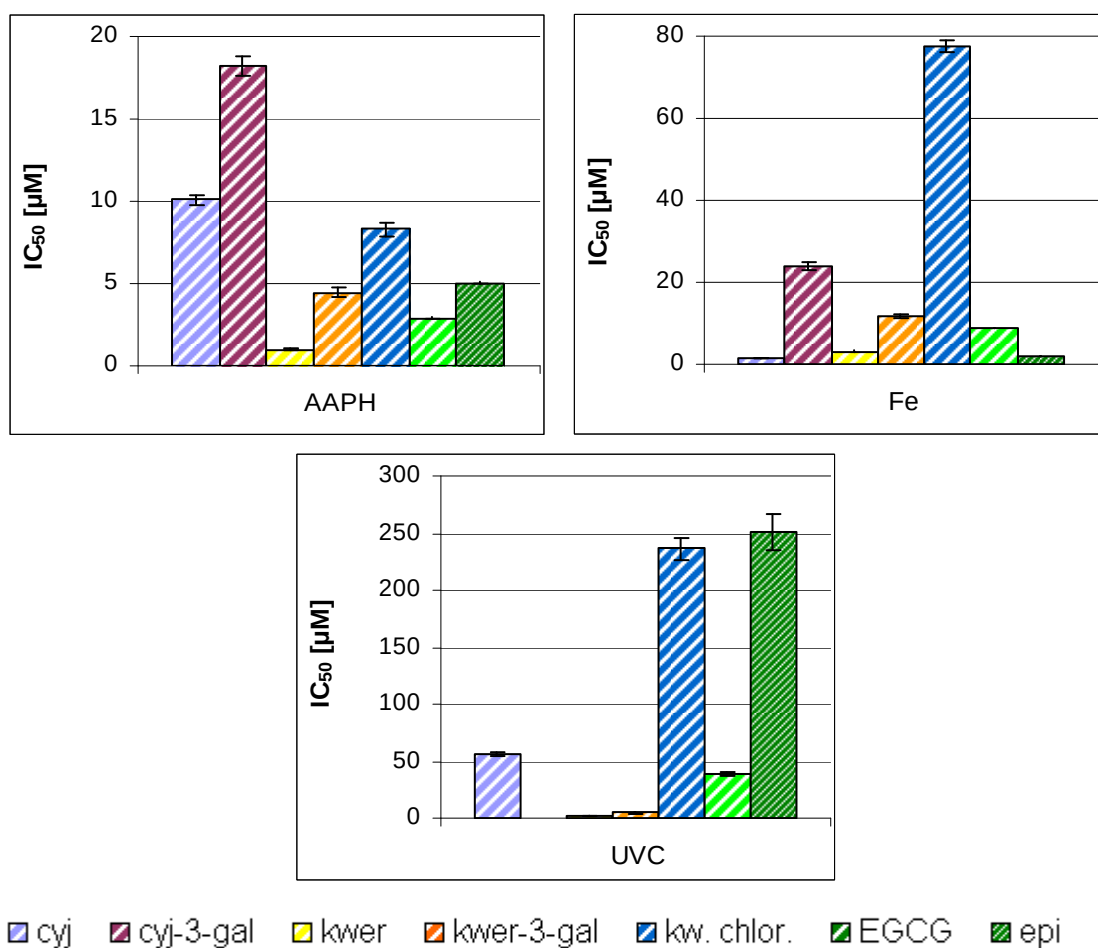
Rys. 54. Współczynniki podziału ekstraktów polifenolowych pomiędzy oktanol i wodę, wyrażone jako logP. Oznaczanie wykonywano według procedury opisanej w rozdziale 4.4.10. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 7\%$. Wykres sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 12.



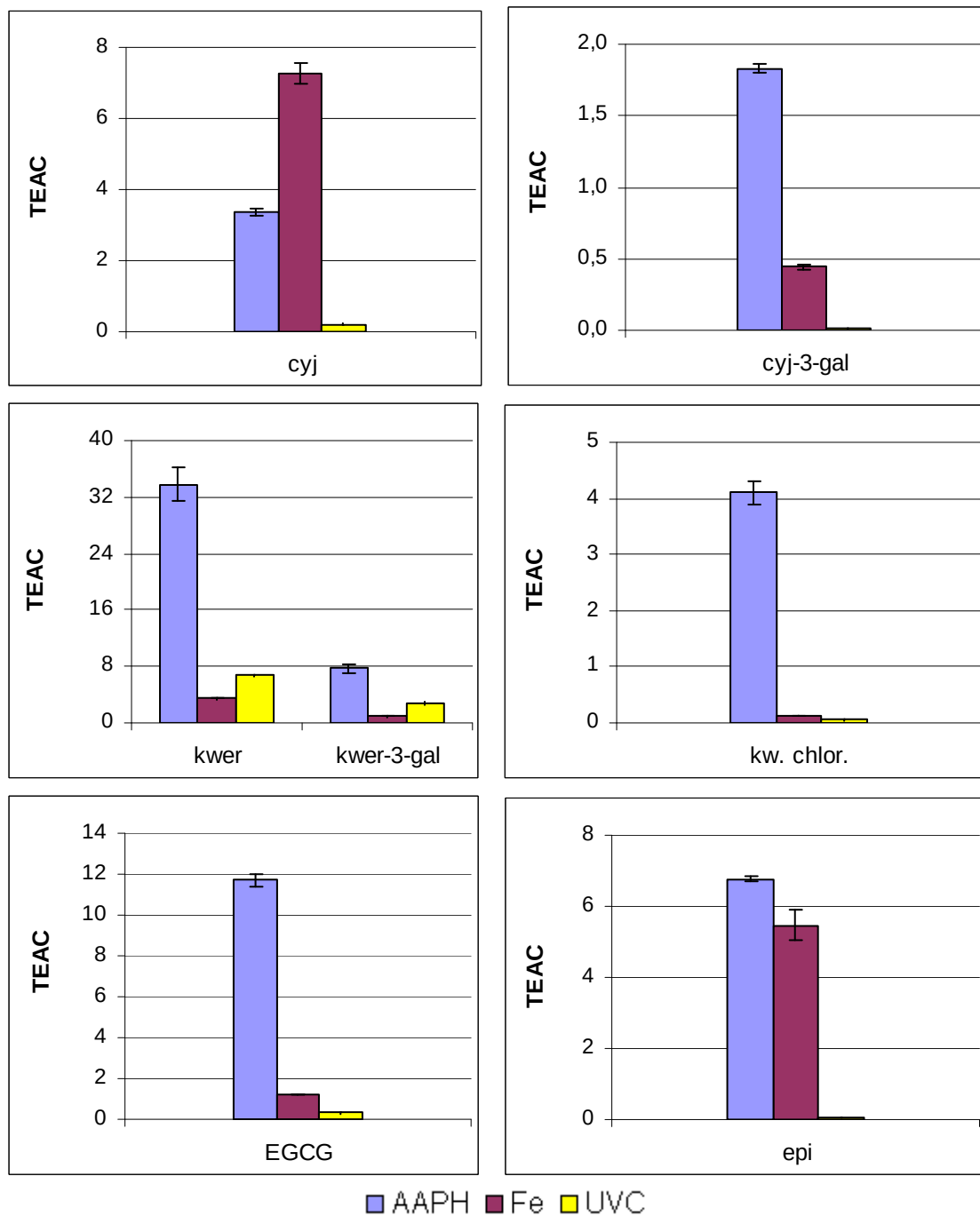
Rys. 55. Wartości stałych dysocjacji (K_d) ekstraktów roślinnych w układzie liposomy EYPC:bufor. Oznaczanie wykonywano według procedury opisanej w rozdziale 4.4.11. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 8\%$. Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 12.



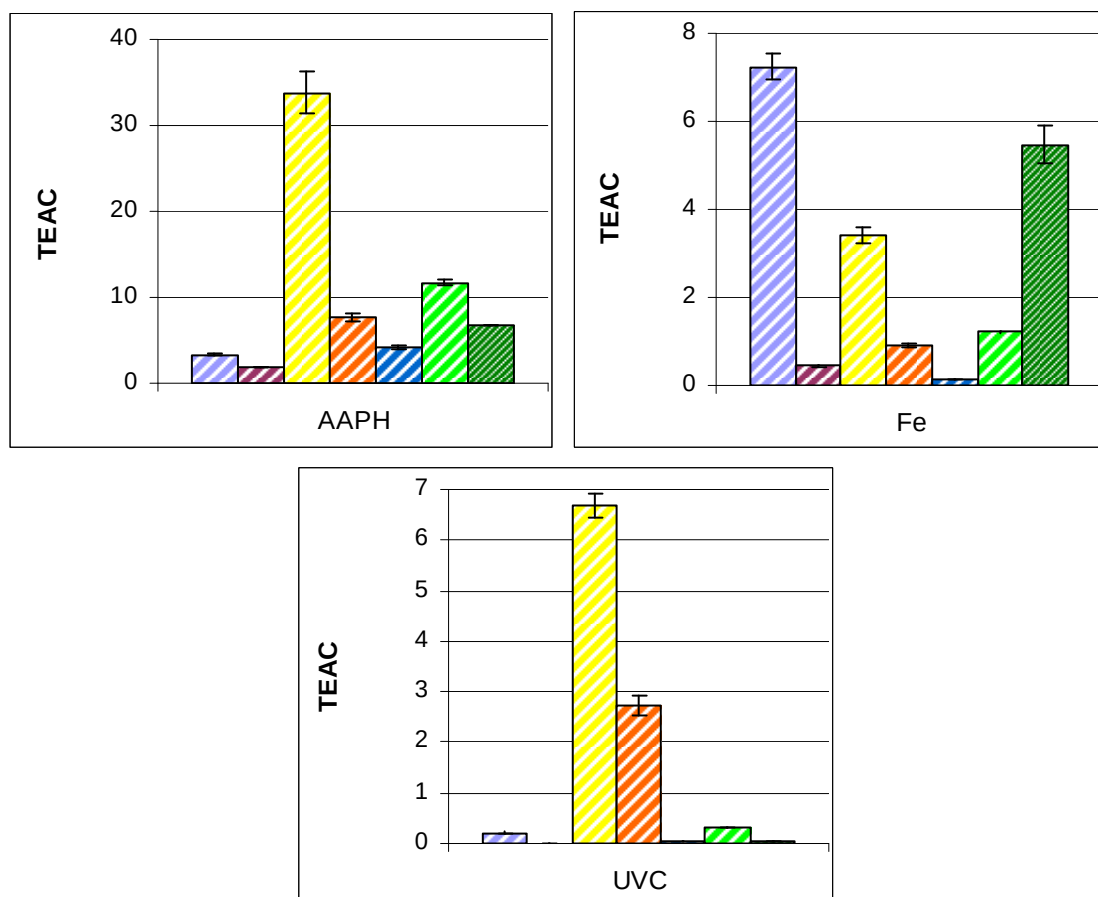
Rys. 56a. Wartości parametrów IC₅₀ [mM] flawonoidów wyznaczone w teście TBARS. Liposomy uformowane z EYPC uzyskano według procedury 4.4.1a. Utleniania indukowano trzema czynnikami: związkiem AAPH, jonami Fe²⁺/askorbinian (1:5, m/m) oraz promieniowaniem UVC. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 8\%$. Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 13a.



Rys. 56b. Wartości parametrów IC₅₀ [mM] flawonoidów wyznaczone w teście TBARS. Liposomy uformowane z EYPC uzyskano według procedury 4.4.1a. Utleniania indukowano trzema czynnikami: związkiem AAPH, jonami Fe²⁺/askorbinian (1:5, m/m) oraz promieniowaniem UVC. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało ± 8 %. Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 13b. Na wykresie UVC nie zamieszczono danej dla cyjanidyno-3-galaktozydu IC₅₀ = 1300 ± 33,32 [μM].

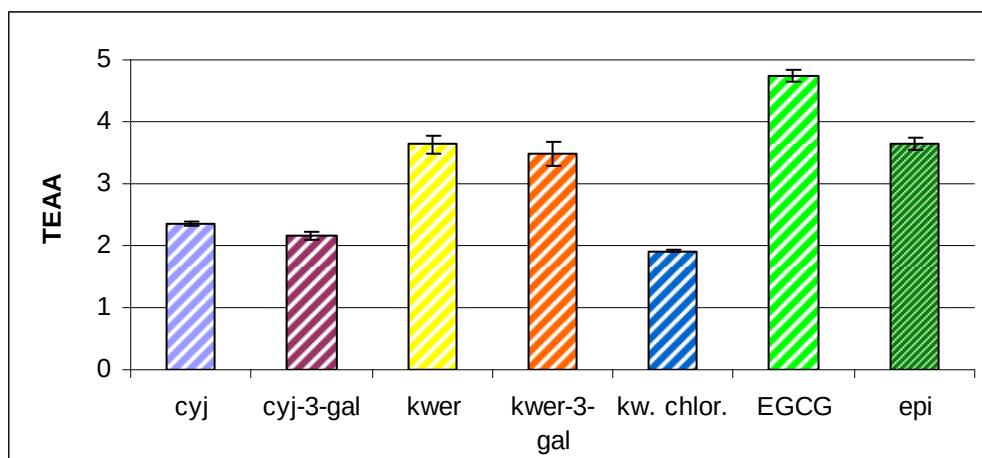


Rys. 57a. Wartości parametrów TEAC (ang. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) flawonoidów wyznaczone w teście TBARS. Liposomy uformowane z EYPC uzyskano według procedury 4.4.1a. Utleniania indukowano trzema czynnikami: związkiem AAPH, jonami Fe^{2+} /askorbinian (1:5, m/m) oraz promieniowaniem UVC. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 8\%$. Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 14a.

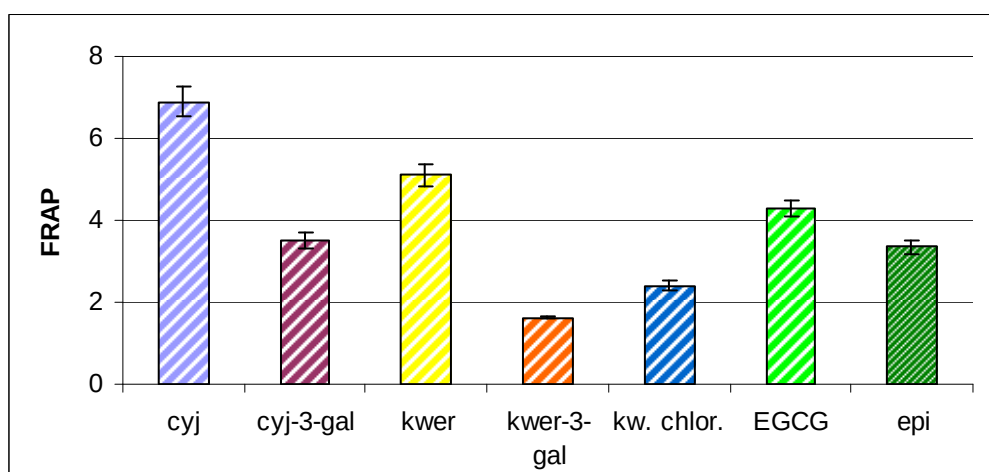


■ cyj
 ■ cyj-3-gal
 ■ kwer
 ■ kwer-3-gal
 ■ kw. chlor.
 ■ EGCG
 ■ epi

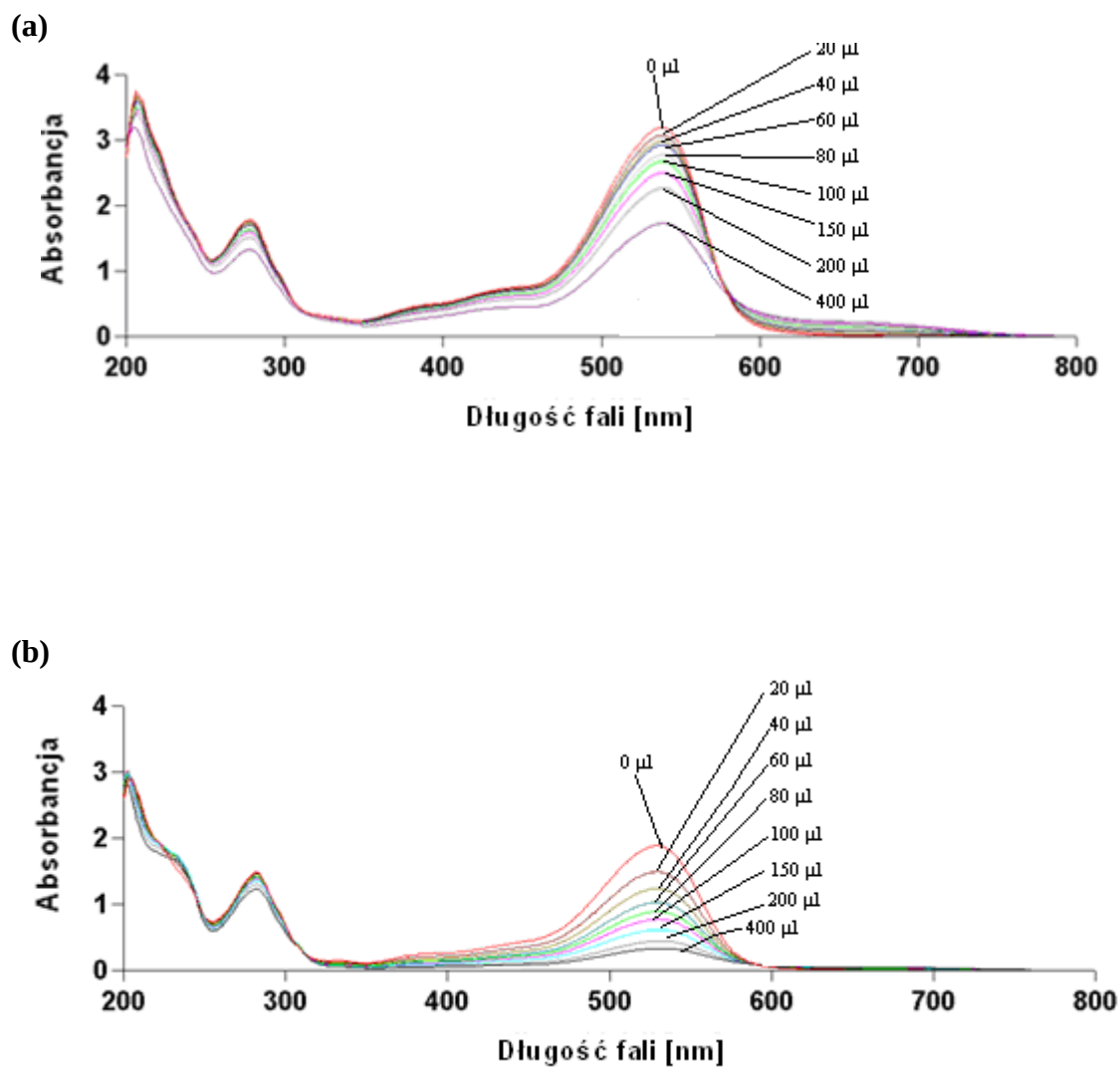
Rys. 57b. Wartości parametrów TEAC (ang. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) flawonoidów uzyskane w teście TBARS. Liposomy uformowane z EYPC uzyskano według procedury 4.4.1a. Utleniania indukowano trzema czynnikami: związkiem AAPH, jonami Fe^{2+} /askorbinian (1:5, m/m) oraz promieniowaniem UVC. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 8\%$. Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 14b.



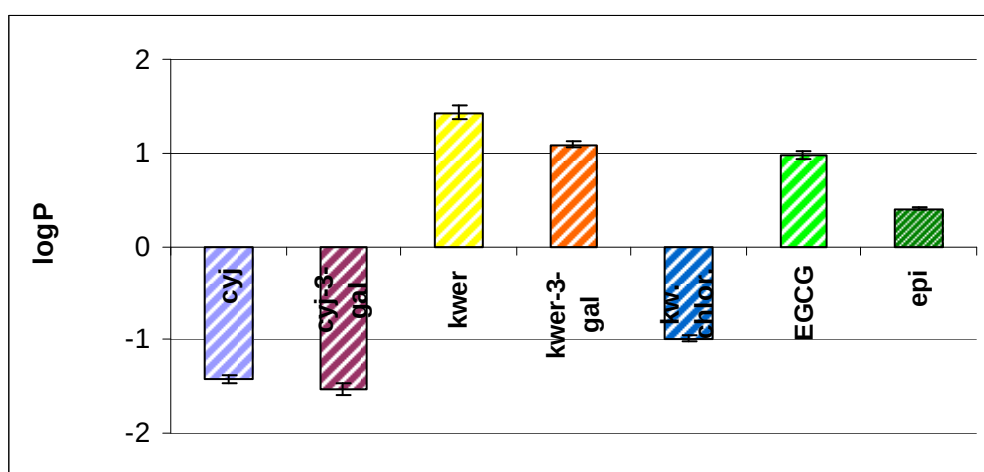
Rys. 58. Wartości parametrów TEAA (ang. Trolox Equivalent Antioxidant Activity) flawonoidów. Właściwości przeciwrodnikowe badano wobec wolnego rodnika DPPH $\cdot$ według procedury 4.4.4. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 6 \%$, Wykres sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 15.



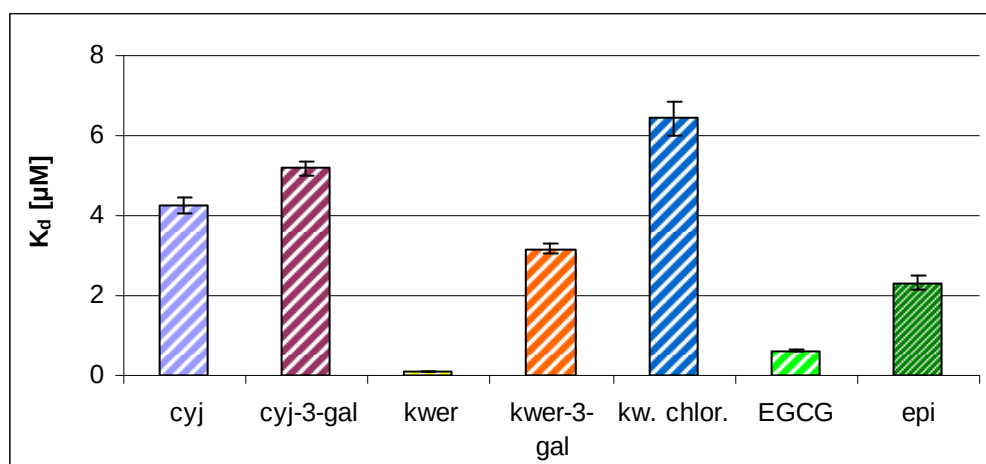
Rys. 59. Wartości parametrów FRAP (ang. Ferric Reducing Antioxidant Power) flawonoidów. Oznaczanie zdolności do redukowania jonów ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) wykonywano według procedury 4.4.5. Wartości otrzymano z pięciu niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 7 \%$. Wykres sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 15.



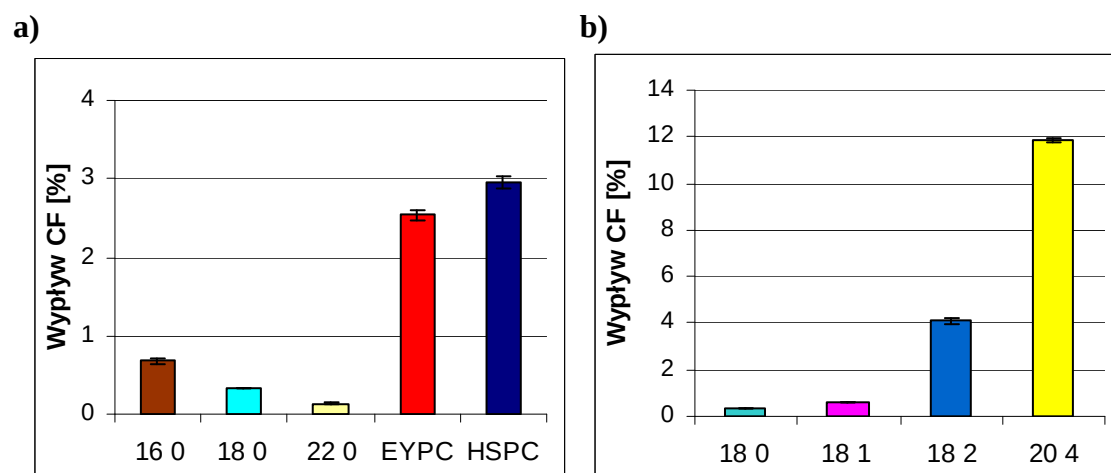
Rys. 60. Widma absorpcyjne UV-Vis (a) cyjanidyny oraz (b) cyjanidyno-3-galaktozydu miareczkowanych 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 i 400 μl 2mM roztworu FeCl_2 . Stężenie początkowe flawonoidów wynosiło 0,1 mM natomiast końcowe wynosiło 0,08 mM. Oznaczanie wykonywano według procedury opisanej w 4.4.9.



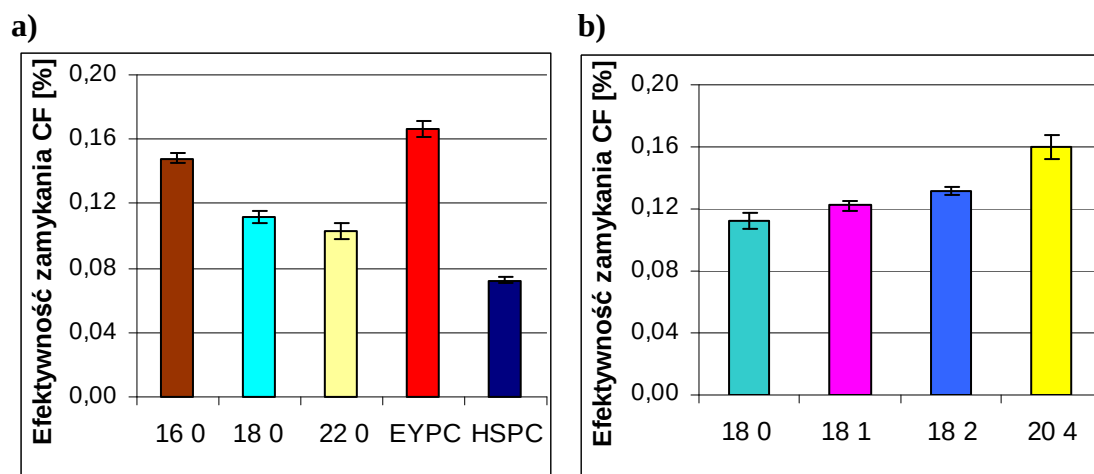
Rys. 61. Współczynniki podziału flawonoidów pomiędzy oktanol i wodę, wyrażony jako logP. Oznaczanie wykonywano według procedury opisanej w rozdziale 4.4.10. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 5\%$. Wykres sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 17.



Rys. 62. Stałe dysocjacji (K_d) flawonoidów w układzie liposomy EYPC:bufor. Oznaczanie wykonywano według procedury opisanej w rozdziale 4.4.11. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 8\%$. Wykres sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 17.

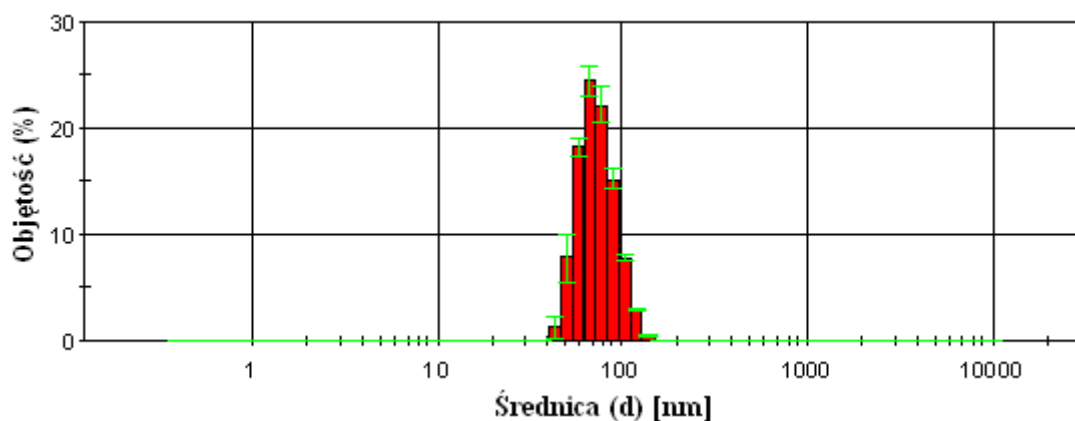


Rys. 63. Procentowy wpływ karboksyfluoresceiny (CF) z liposomów uformowanych z różnych lipidów o różnej długości łańcucha acylowego (a) oraz w zależności od liczby wiązań podwójnych w łańcuchu aryłowym. Oznaczanie wykonywano według procedury opisanej w rozdziale 4.4.12. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 5\%$. Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 18 i 19.

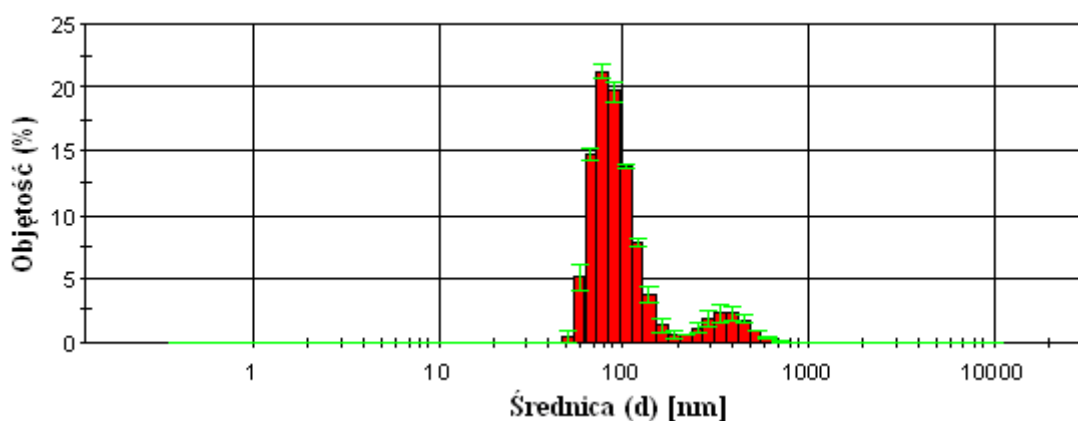


Rys. 64. Procentowa efektywność zamykania karboksyfluoresceiny (CF) w liposomach uformowanych z różnych lipidów o różnej długości łańcucha acylowego (a) oraz w zależności od liczby wiązań podwójnych w łańcuchu acylowym (b) Oznaczenie wykonywano według procedury opisanej w rozdziale 4.4.13. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 5\%$. Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 18 i 19.

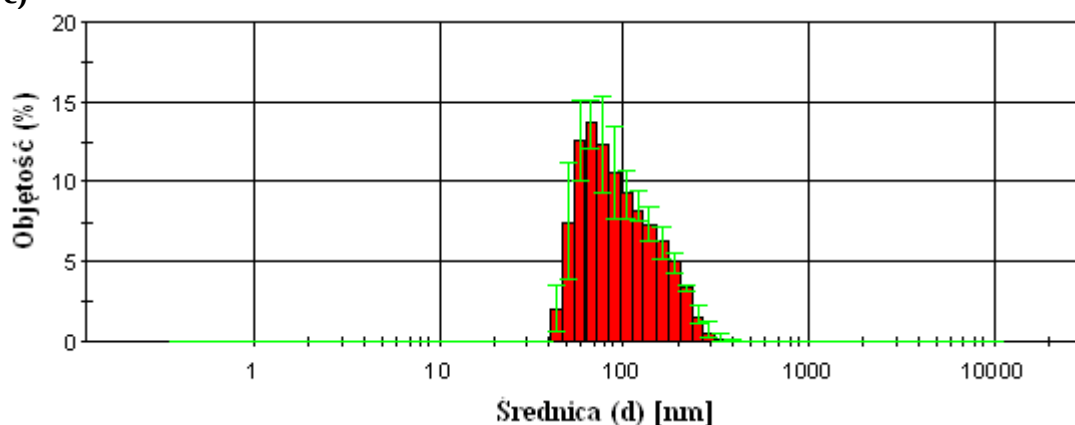
a)



b)

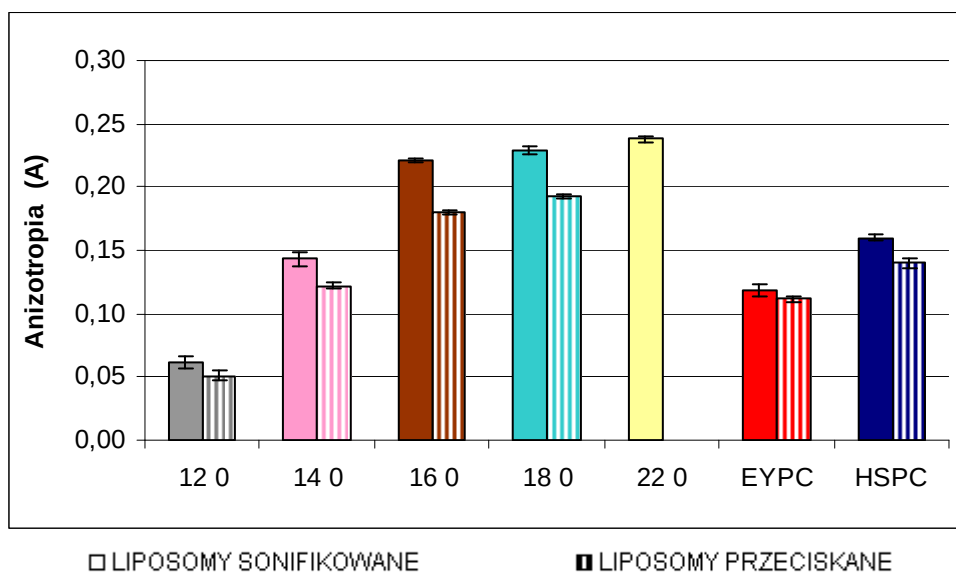


c)

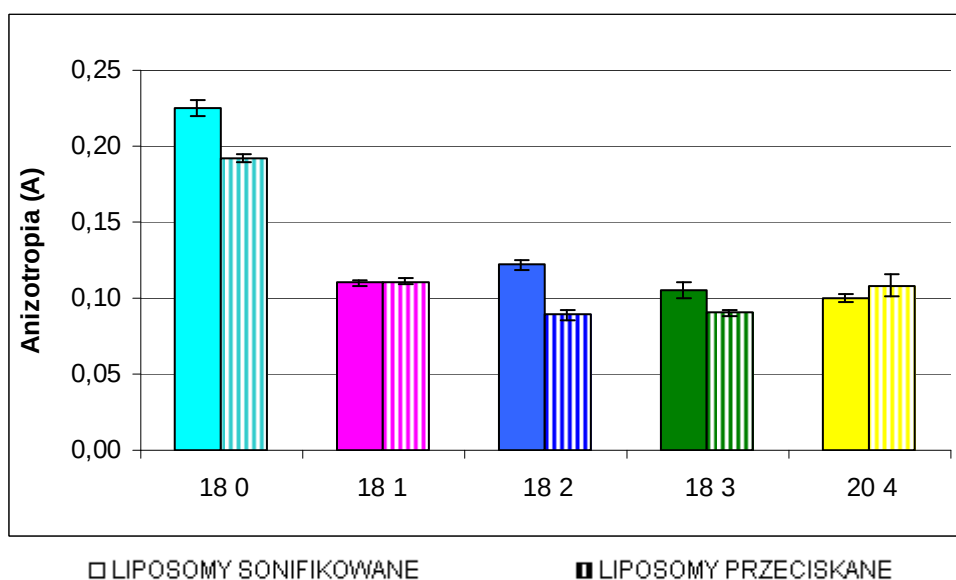


Rys. 65. Przykładowe histogramy średnic liposomów. Liposomy otrzymano poprzez kalibrację przez filtry poliwęglanowe o porach 100 nm według procedury 4.4.1b: a) z lipidu o 18 atomach węgla oraz trzech wiązaniach podwójnych w łańcuchu acylowym (18:3), b) z lipidu o 18 atomach węgla oraz jednym wiązaniem podwójnym w łańcuchu acylowym (18:1) c) fosfatydylocholiny jajecznej (EYPC). Pomiary wielkości dokonano według procedury 4.4.14.

a)

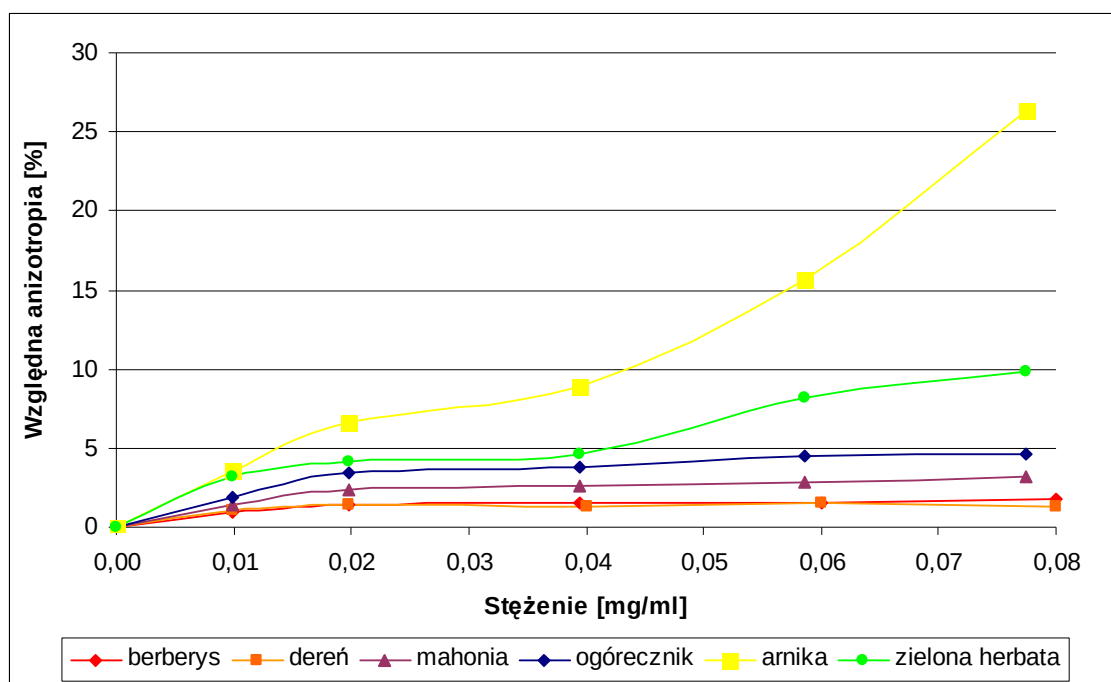


b)

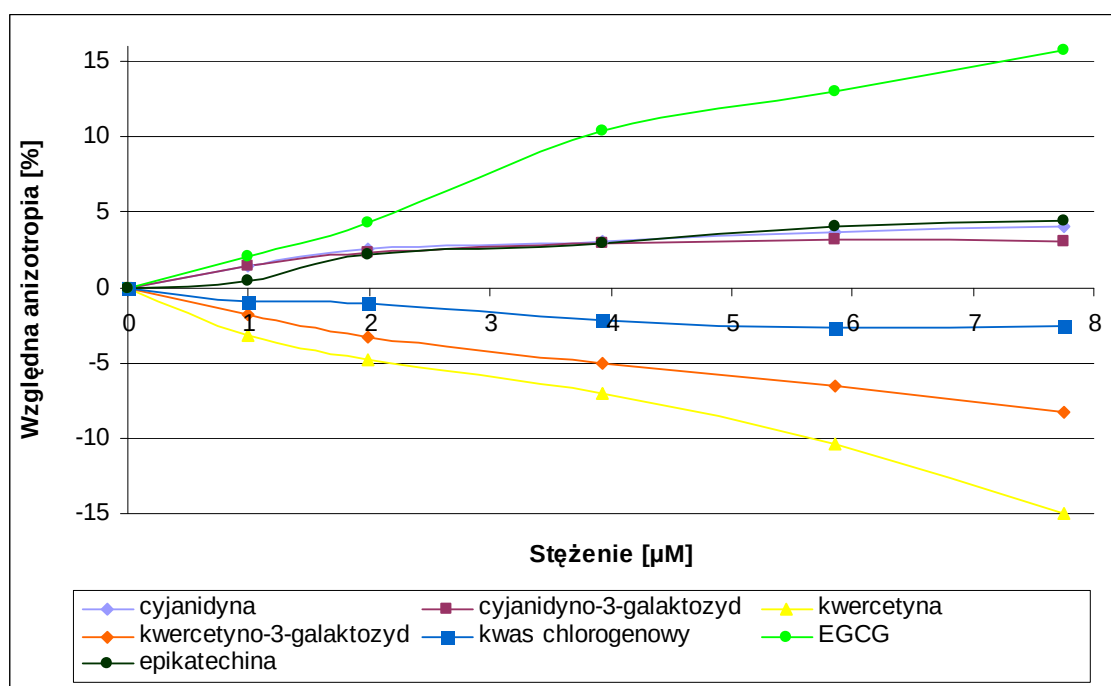


Rys. 66. Anizotropia fluorescencji sondy DPH w liposomach uformowanych z lipidów różniących się:

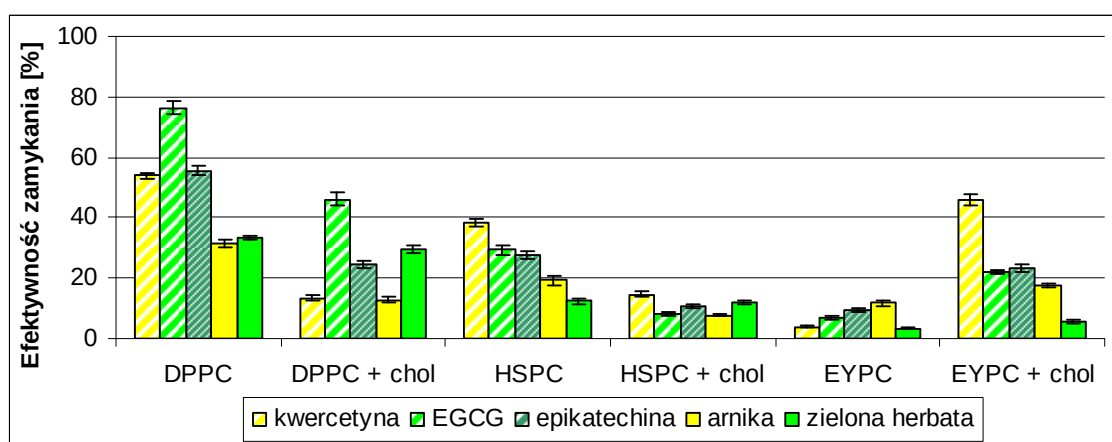
a) długością łańcucha węglowodorowego oraz (b) liczbą wiązań podwójnych w łańcuchu cząsteczki, otrzymanych dwiema metodami: sonifikacji oraz przeciskania przez filtry poliwęglanowe o średnicy 100 nm, opisanymi w rozdziale 4.4.1a i 4.4.1b. Doświadczenie wykonywano według procedury opisanej w rozdziale 4.4.15. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało $\pm 8\%$. Wykresy sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 27 oraz 28.



Rys. 67. Zależność względnej anizotropii sondy TMA-DPH w błonach liposomów DPPC, w temperaturze pokojowej, od stężenia: ekstraktów z berberysu, derenia, mahonii, ogórecznika, arniki oraz zielonej herbaty. Liposomy przygotowano według procedury opisanej w punkcie 4.4.2. Doświadczenie wykonywano według procedury opisanej w rozdziale 4.4.16. Wartości otrzymano z pięciu niezależnych powtórzeń.



Rys. 68. Zależność względnej anizotropii sondy TMA-DPH w błonach liposomów DPPC, w temperaturze pokojowej, od stężenia: cyjanidyny, cyjanidyno-3-galaktozydu, kwercetyny, kwercetyno-3-galaktozydu, kwasu chlorogenowego, EGCG oraz epikatechiny. Liposomy przygotowano według procedury opisanej w punkcie 4.4.2. Doświadczenie wykonywano według procedury opisanej w rozdziale 4.4.16. Wartości otrzymano z pięciu niezależnych powtórzeń.



Rys. 69. Procent zamykania przeciwutleniaczy w liposomach o różnym składzie lipidowym. Doświadczenie wykonywano według procedury opisanej w rozdziale 4.4.17. Wartości otrzymano z trzech niezależnych doświadczeń. Odchylenie standardowe nie przekraczało ± 8 %. Wykres sporządzono na podstawie danych zawartych w załączniku 30.