

Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu
Wydział Towaroznawstwa
Katedra Instrumentalnych Metod Oceny Jakości

PRACA DOKTORSKA

**Aktywność przeciwutleniająca i proutleniająca katechin
występujących w herbacie zielonej**

mgr inż. Małgorzata Muzolf-Panek

PROMOTOR:
dr hab. Bożena Tyrakowska, prof. nadzw. UEP

Poznań, 2009

Pani dr hab. Bożenie Tyrakowskiej dziękuję za opiekę naukową i cenne wskazówki udzielone w trakcie realizacji niniejszej pracy oraz za okazaną życzliwość

Dr inż. Annie Gliszczyńskiej-Świgło oraz dr hab. Henrykowi Szymusiakowi serdecznie dziękuję za współpracę oraz udzielone rady i życzliwość

Dziękuję również wszystkim Koleżankom i Kolegom z Katedry Instrumentalnych Metod Oceny Jakości

Mojemu Mężowi i Rodzicom z całego serca dziękuję za duchowe wsparcie i cierpliwość

Picie zielonej herbaty dla Chińczyków jest swego rodzaju filozofią - drogą wiodącą do harmonii, spokoju ducha i prostoty, dla Japończyków stanowi podstawę kultu estetyzmu i piękna, dla wszystkich natomiast może być drogą do zdrowia.

Spis treści

WSTĘP	8
CZĘŚĆ LITERATUROWA	11
Rozdział I. Herbata zielona	11
1. Herbata zielona w ochronie zdrowia człowieka	13
2. Skład chemiczny herbaty zielonej	15
Rozdział II. Katechiny	21
3. Struktura chemiczna katechin	21
4. Występowanie katechin w produktach spożywczych	22
5. Właściwości biologiczne katechin występujących w herbacie zielonej	23
5.1. Właściwości przeciwutleniające katechin	25
5.1.1. Mechanizmy działania przeciwutleniającego katechin	25
5.1.2. Czynniki fizyko-chemiczne wpływające na aktywność przeciwutleniającą katechin	28
5.1.3. Czynniki wpływające na aktywność przeciwutleniającą herbaty zielonej	33
5.1.4. Aktywność przeciwutleniająca katechin i herbaty zielonej <i>in vivo</i>	35
5.2. Właściwości proutleniające katechin	37
5.2.1. Mechanizmy działania proutleniającego	38
5.2.2. Czynniki fizyko-chemiczne wpływające na aktywność proutleniającą katechin	43
6. Znaczenie właściwości przeciw- i pro-utleniających katechin w profilaktyce chorób cywilizacyjnych	45
7. Rola katechin w kształtowaniu i ochronie jakości żywności	51
CEL PRACY I ZAŁOŻENIA BADAWCZE	57
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	58
Rozdział III. Materiały i metody	58
8. Materiały	58
8.1. Katechiny	58
8.2. Herbaty zielone	60
8.3. Pozostałe odczynniki	60
8.4. Przygotowanie roztworów do badań	62
8.4.1. Wodne ekstrakty z herbat zielonych	62
8.4.2. Roztwory badanych przeciwutleniaczy oraz ekstraktów z herbat zielonych do pomiaru aktywności przeciwutleniającej TEAC	62
8.4.3. Roztwory ekstraktów z herbat zielonych oraz Troloksu do pomiaru aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH	63

8.4.4. Bufor LSB (ang. <i>Low Salt Buffer</i>) do lizy komórek.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
8.4.5. Roztwór lucyferyny	64
8.5. Aparatura i sprzęt	64
9. Metody badań	65
9.1. Wyznaczanie aktywności przeciwutleniającej metodą TEAC	65
9.2. Wyznaczanie aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH	66
9.3. Wyznaczanie pKa katechin	67
9.4. Oznaczanie całkowitej zawartości polifenoli metodą Folin-Ciocolteu'a	68
9.5. Oznaczanie zawartości katechin metodą HPLC	68
9.6. Pomiar poziomu indukcji ekspresji genu kodującego oksydoreduktazę NAD(P)H:chinon 1 (NQO1) metodą EpRE-LUX.....	69
9.7. Pomiar poziomu indukcji ekspresji genu kodującego oksydoreduktazę NAD(P)H:chinon 1 (NQO1) w komórkach ze zmodyfikowanym poziomem glutationu.....	70
9.8. Detekcja chinonów katechin.....	71
9.9. Analiza statystyczna	72
Rozdział IV. Wyniki badań i dyskusja	73
10. Czynniki wpływające na aktywność przeciwutleniającą wybranych herbat zielonych	73
10.1. Wpływ zawartości związków polifenolowych na aktywność przeciwutleniającą wodnych ekstraktów z herbat zielonych.....	73
10.2. Wartość TEAC jako parametr do oceny jakości ekstraktów z herbat zielonych.....	79
10.3. Wpływ pH środowiska na aktywność przeciwutleniającą TEAC wodnych ekstraktów z herbat zielonych.....	81
11. Czynniki wpływające na aktywność przeciwutleniającą katechin	83
11.1. Wpływ pH środowiska na aktywność przeciwutleniającą katechin.....	84
11.2. Wpływ właściwości kwasowo-zasadowych na aktywność przeciwutleniającą katechin.....	90
11.3. Wpływ struktury na właściwości przeciwutleniające katechin	93
11.3.1. Liczba i rozmieszczenie grup hydroksylowych w cząsteczkach katechin	93
11.3.2. Zależność wartości TEAC katechin od parametrów molekularnych charakteryzujących ich zdolność do oddawania atomu wodoru lub elektronu	95
12. Właściwości proutleniające katechin.....	100
12.1. Indukcja ekspresji genu kodującego oksydoreduktazę NAD(P)H:chinon 1 (NQO1) przez katechiny	101
12.2. Rola właściwości proutleniających katechin w mechanizmie indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 za pośrednictwem EpRE	105
12.2.1. Indukcja ekspresji genu kodującego NQO1 przez katechiny w komórkach z modyfikowanym poziomem glutationu	105

12.2.2. Zależności pomiędzy parametrami charakteryzującymi łatwość utleniania katechin a ich zdolnością do indukcji NQO1	108
12.2.3. Zdolność katechin do tworzenia chinonów <i>in vitro</i>	109
PODSUMOWANIE	112
Literatura	119
Spis tabel	131
Spis rysunków	132
Wykaz skrótów i symboli stosowanych w pracy	134

WSTĘP

Pojęcie jakości definiowane współcześnie jako „wyjście naprzeciw lub przekraczanie preferencji konsumentów” w odniesieniu do żywności obejmuje wiele różnych aspektów [Luning et al. 2005]. Na jakość żywności składają się zarówno cechy zewnętrzne, takie jak: parametry produkcji, aspekty środowiskowe oraz marketing, jak i cechy wewnętrzne (związane bezpośrednio z właściwościami fizycznymi produktów), do których zalicza się: bezpieczeństwo i aspekty zdrowotne produktu, właściwości sensoryczne i trwałość oraz niezawodność produktu (np. odpowiednia masa i skład), a także wygoda w użyciu.

Jakość żywności stanowi na rynku istotną i wyróżniającą cechę. Konsumenty mają emocjonalny stosunek do żywności, której jakość znacząco wpływa na ich samopoczucie i zdrowie. Szczególnie ważne w odniesieniu do konsumentów są dwie cechy jakości żywności: jej bezpieczeństwo i aspekty zdrowotne. Żywność bezpieczna powinna być wolna od zagrożeń biochemicznych, mikrobiologicznych i fizycznych z dopuszczalnym ryzykiem. W wyniku wystąpienia jakiegokolwiek z wymienionych zagrożeń zmiana ulega nie tylko jakość sensoryczna żywności, ale także jej wartość odżywcza i jakość zdrowotna. Aspekty zdrowotne jakości żywności odnoszą się do składu jakościowego i ilościowego produktów żywnościowych oraz diety. Zakłócenie równowagi pomiędzy składnikami diety powoduje negatywne konsekwencje dla zdrowia człowieka [Luning et al. 2005].

Obecnie w przemyśle spożywczym stosuje się wiele zabiegów mających na celu ograniczenie występowania różnego rodzaju zagrożeń. Kluczowe znaczenie dla bezpieczeństwa żywności oraz jej aspektów zdrowotnych ma ochrona jej składników przed utlenianiem. Zahamowanie tego procesu znacznie wpływa na zachowanie walorów sensorycznych i wartości odżywczej produktu, co znajduje odzwierciedlenie w większej akceptacji produktu przez konsumentów. Ponadto wydłuża to czas przechowywania produktu. By zapobiec niekorzystnym zmianom wywołanym procesami utleniania oraz przedłużyć trwałość produktów przemysł spożywczy stosuje różnego rodzaju zabiegi takie jak np. pakowanie produktów w próżni czy w atmosferze gazu obojętnego. Jednakże dla wielu produktów jest to niewystarczające, dlatego niezbędny jest dodatek przeciwutleniaczy syntetycznych lub naturalnych. Obie grupy przeciwutleniaczy posiadają zalety i wady, jednakże w kontekście zdrowia ludzkiego przeciwutleniacze naturalne wydają się bardziej bezpieczne niż syntetyczne i wzbudzają rosnące zainteresowanie zarówno konsumentów, jak i producentów. Ponadto, w ostatnich latach, zwraca się coraz większą uwagę na potrzeby

i oczekiwania konsumentów w zakresie składu jakościowego żywności. Odzwierciedleniem takiej tendencji jest nowa grupa produktów o specjalnie zaprojektowanym składzie zaliczana do kategorii żywności funkcjonalnej. Celem żywności funkcjonalnej jest dostarczanie organizmowi składników, które pełnią istotną rolę w utrzymaniu i/lub poprawie zdrowia.

Istotną rolę w kształtowaniu jakości żywności, szczególnie w zakresie jej bezpieczeństwa oraz aspektów zdrowotnych mają katechiny (flawan-3-ole), których najbogatszym źródłem jest herbata zielona. Znamioną cechą katechin jest ich wysoka aktywność przeciwutleniająca. Wyniki wielu badań potwierdzają, że ekstrakty z herbat zielonych mogą być dobrym i stosunkowo niedrogim źródłem przeciwutleniaczy dodawanych do żywności w celu ochrony jej składników przed utlenianiem [Gramza et al. 2006, Tang et al. 2002, 2006]. Zaletą katechin i ekstraktów z herbat zielonych jako naturalnych przeciwutleniaczy jest przede wszystkim brak charakterystycznego smaku i zapachu.

Katechiny poza właściwościami przeciwutleniającymi posiadają także właściwości przeciwnowotworowe, przeciwmutagenne, przeciwbakteryjne i przeciwzapalne. Dzięki szerokiej gamie właściwości biologicznych mogą one zapobiegać rozwojowi lub wspomagać walkę z chorobami, takimi jak nowotwory, choroby neurodegeneracyjne i sercowo-naczyniowe [Cooper et al. 2005a, b, Pan et al. 2003, Riemersma et al. 2001]. Właściwości pro-zdrowotne katechin wykorzystuje się w produktach żywnościowych zaliczanych do grupy żywności funkcjonalnej, takich jak ciastka, płatki śniadaniowe, błyskawiczny makaron, coca cola, chipsy oraz guma do żucia (patent numer 2001/6,248,346). Do kategorii żywności funkcjonalnej zalicza się również herbatę zieloną. Regularna konsumpcja herbaty ogranicza bowiem występowanie nowotworów, chorób sercowo-naczyniowych oraz zapobiega otyłości i cukrzycy.

Ze względu na ważną rolę, jaką katechiny odgrywają zarówno w ochronie żywności przed utlenianiem jej składników, jak i w profilaktyce chorób cywilizacyjnych ważne jest lepsze poznanie czynników, które decydują o właściwościach przeciw- i pro-utleniających katechin, jak i mechanizmów ich działania. Z dotychczasowych danych literaturowych wynika, że wysoka aktywność przeciwutleniająca katechin zależy od liczby grup hydroksylowych oraz obecności charakterystycznych ugrupowań strukturalnych w ich cząsteczkach [Nanjo et al. 1996, Salah et al. 1995]. Brak natomiast danych na temat wpływu pH środowiska oraz właściwości kwasowo-zasadowych katechin na ich aktywność przeciwutleniającą. Ponadto, ze względu na stosowanie katechin lub ekstraktów z herbat zielonych jako suplementów diety, należy mieć na uwadze potencjalne zagrożenia z tego wynikające. Wiadomo bowiem, że w wyniku utleniania katechin (będącego konsekwencją ich

działania przeciwutleniającego) mogą powstawać wysoce reaktywne metabolity katechin o strukturze chinonów [Sang et al. 2005a, b]. Chinony te w reakcjach cyklu redoks z udziałem tlenu cząsteczkowego mogą generować duże ilości reaktywnych form tlenu, które uszkadzają różnego rodzaju makrocząsteczki komórek, takie jak np. DNA, RNA i białka, co powoduje zmianę ich struktury i funkcji, a w konsekwencji prowadzi do powstawania i rozwoju wielu chorób tzw. cywilizacyjnych. Dlatego na etapie projektowania i produkcji żywności bardzo ważne jest wykorzystanie wiedzy na temat czynników decydujących o aktywności biologicznej składników żywności oraz mechanizmów działania tych składników w organizmie, której źródłem są badania podstawowe.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań mające na celu określenie czynników decydujących o aktywności przeciwutleniającej ekstraktów z herbat zielonych oraz wybranych katechin występujących w tych herbatach. Sprawdzono również możliwość wykorzystania parametru TEAC, charakteryzującego aktywność przeciwutleniającą, do oceny jakości ekstraktów z herbat zielonych. Ponadto zbadano zdolność katechin, występujących w herbatach zielonych, do indukcji ekspresji genu kodującego ważny enzym detoksykacyjny – oksydoreduktazę NAD(P)H:chinon 1 oraz określono rolę właściwości protleniających katechin w mechanizmie tej indukcji.

CZEŚĆ LITERATUROWA

Rozdział I. Herbata zielona

Herbata jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych napojów na świecie, znanym człowiekowi od około 5 tysięcy lat. Odkryta została w starożytnych Chinach, według legendy, w 2737 r. p.n.e., przez chińskiego cesarza Sheng-Nung, który stosował ją wyłącznie jako środek leczniczy i wzmacniający. Walory sensoryczne herbaty zielonej doceniono dopiero za czasów panowania dynastii Tang w Chinach (618-910 r.) zwanych *złotym wiekiem herbaty*. Wówczas herbatę zaczęto pić na co dzień dla przyjemności i orzeźwienia. Mimo, że herbata trafiła do Japonii dopiero w IX wieku, szybko zyskała sławę [Pettigrew 1998]. Picie herbaty urosło do rangi ceremonii, wokół której powstała cała filozofia zwana *Drogą Herbaty* lub *Herbatyzmem*, czyli zamiłowaniem do estetyzmu i piękna [Kakuzō 1986].

Do Europy herbata dotarła na przełomie XVI i XVII wieku. Początkowo była dobrem luksusowym ze względu na wysoką cenę podyktowaną głównie ogromnymi podatkami. Funt herbaty (~0,45 kg) kosztował wówczas tyle, co tygodniowa praca przeciętnego człowieka, nie więc dziwnego, że herbata stała się obiektem nieuczciwych praktyk. Herbatę fałszowano dodając liści lukrecji barwionych melasą i gliną oraz liści jesionu, susząc je, piekąc, depcząc, przesiewając i zwilżając w owczym łajnie [Pettigrew 1998].

Obecnie herbata, mimo iż stała się dobrem powszechnym, nadal stanowi przedmiot nieuczciwych praktyk produkcyjnych. Herbatę fałszuje się dodając herbaty wyekstrahowanej, zepsutych liści herbaty, obciążając ją gliną lub gipsem czy też dodając sztucznych barwników [Waszkiewicz-Robak 2003]. Do częstych zafałszowań herbaty należy dodawanie do niej liści borówek lub jeżyn. Zdarzają się również przypadki nielegalnych praktyk w postaci dodatku do herbat liści roślin o niebezpiecznych dla ludzkiego organizmu właściwościach jak chociażby liście rośliny *Eurycoma loniofolia* (Tongkat Ali) – posiadającej właściwości wzmacniające działanie testosteronu [Raport RASFF 2006].

W XVII i XVIII wieku herbatę do Europy importowano głównie z Japonii i Chin, później (XIX w.), w wyniku zatargu z Chinami, również z Indii. Obecnie herbatę produkuje się w około 40 krajach świata, a wielkość produkcji przekracza 3,5 mln ton rocznie. Głównymi producentami herbaty nadal są Chiny i Indie (tabela 1).

Tabela 1. Główni producenci herbaty na świecie

Kraje (udział w świecie w %)	2000	2004	2006
Chiny	23,7	25,6	28,8
Indie	27,9	25,5	24,5
Sri Lanka	10,3	9,2	8,5
Kenia	8,0	8,8	8,5
Turcja	4,7	6,0	5,6
Indonezja	5,5	4,9	4,7
Wietnam	2,4	3,2	3,9
Japonia	2,9	3,0	2,5
Argentyna	2,5	1,9	1,9
Iran	1,7	1,7	1,6
Świat (mln ton)	2,965	3,342	3,649

Źródło: [Rocznik Statystyczny RP 2007 i 2008]

W początkach XVII wieku przedmiotem handlu z krajami azjatyckimi była herbata zielona, jednak ze względu na nietrwałość jej aromatu podczas kilkumiesięcznego transportu, zaczęto sprowadzać do Europy herbatę czarną, która wyparła na kilka wieków z europejskich stołów herbatę zieloną [Pettigrew 1998]. Do dzisiaj herbata czarna cieszy się dużą popularnością w Europie oraz Północnej Ameryce i Afryce, natomiast herbata zielona wśród narodów azjatyckich, szczególnie w Chinach i Japonii.

Obecnie głównymi konsumentami herbaty na świecie są Irlandia i Wielka Brytania (około 3 kg/osobę/rok). Polska, pod względem ilości spożywanej herbaty, znajduje się na trzecim miejscu w Europie – rocznie około 1 kg herbaty/osobę [Gorczyca 2008, Rocznik Statystyczny RP 2008]. Wyżej wyróżnieni liderzy w ilości spożywanej herbaty to głównie konsumenci herbaty czarnej, która jeszcze parę lat temu stanowiła około 78% produkcji herbaty ogółem, podczas gdy herbata zielona 22% [Cabrera et al. 2006]. W ostatnich kilkunastu latach wzrosło jednak zainteresowanie herbatą zieloną ze względu na pozytywny związek pomiędzy jej konsumpcją a zdrowiem człowieka, czego dowodem są wyniki badań epidemiologicznych [Barbosa 2007, Cabrera et al. 2006, Cooper et al. 2005a, b, Gao et al. 1994, Peters et al. 2001, Yang G. et al. 2007].

1. Herbata zielona w ochronie zdrowia człowieka

W ostatnich dziesięcioleciach zauważalna jest zmiana w postrzeganiu roli żywności w życiu człowieka. Poza podstawową funkcją żywności, jaką jest dostarczanie ludzkiemu organizmowi niezbędnych do życia substancji odżywczych i zaspokojenie potrzeb głodu i pragnienia, współczesnego konsumenta coraz bardziej interesuje rola żywności w kształtowaniu i ochronie zdrowia [Grajek et al. 2005]. Przyczyną takiego zjawiska jest wzrost świadomości konsumentów, co do wpływu diety na częstotliwość występowania chorób cywilizacyjnych, do których zaliczamy nowotwory, choroby sercowo-naczyniowe, neurodegeneracyjne i inne. Niewątpliwie o dobroczynnym wpływie diety na ludzki organizm można mówić w przypadku konsumpcji herbaty zielonej, której zdrowotne właściwości znano i wykorzystywano od stuleci. Dowodem tego są pierwsze pisemne wzmianki o dobroczynnym działaniu herbaty zielonej zawarte w *Księdze Herbaty* z XII w. autorstwa japońskiego mnicha Eisai. W dziele swym Eisai pisze nie tylko o pozytywnym wpływie picia zielonej herbaty na serce człowieka, ale również podkreśla medyczne zastosowania herbaty zielonej w leczeniu plamistości skóry i choroby beri beri, usuwaniu objawów dyspepsji, stymulowaniu organizmu, zapobieganiu zmęczeniu oraz wspomaganie funkcji mózgu i układu moczowego [Internet].

Obecnie potwierdzeniem pro-zdrowotnych właściwości herbaty zielonej są wyniki badań epidemiologicznych oraz laboratoryjnych badań *in vivo* na zwierzętach [Barbosa 2007, Cabrera et al. 2006, Cooper et al. 2005a, b, Hara 2001, Higdon & Frei 2003, Muzolf & Tyrakowska 2007a]. Wielu autorów wykazało, że konsumpcja zielonej herbaty może obniżyć ryzyko wystąpienia nowotworów piersi, prostaty, jelita grubego i cienkiego, odbytu, pęcherza moczowego, żołądka, trzustki, wątroby, przelyku czy też płuc (tabela 2) [Cooper et al. 2005b, Ju et al. 2007, Landau et al. 2005, Yang C.S. et al. 2005, 2007].

Badania typu *case-control* przeprowadzone w Chinach wykazały, że miesięczne spożycie średnio 100 g herbaty zielonej, w przeliczeniu na suchą masę, zmniejsza ryzyko zachorowania na raka jelita grubego o 37% w stosunku do grupy kontrolnej [Yang G. et al. 2007]. Ryzyko to zależne jest w dużej mierze od ilości i czasu spożywania herbaty. Negatywna korelacja pomiędzy konsumpcją herbaty a ryzykiem wystąpienia nowotworu utrzymuje się nawet przy uwzględnieniu czynników mogących zniekształcać wyniki badań, takich jak styl życia, czynniki demograficzne czy nawyki żywieniowe. Badania Gao i współpracowników [1994] nad związkami pomiędzy spożyciem herbaty zielonej

a nowotworem przełyku dowiodły, że konsumpcja średnio 100 g herbaty, w przeliczeniu na suchą masę, miesięcznie obniża ryzyko raka przełyku o 23%, natomiast zwiększenie ilości herbaty w codziennej diecie (powyżej 150 g suchej masy/miesiąc) zmniejsza to ryzyko nawet o 76%.

Tabela 2. Herbata w prewencji nowotworów: wyniki badań laboratoryjnych na zwierzętach

Rodzaj nowotworu	Pozytywne wyniki	Negatywne wyniki
Płuc	13	1
Przełyku	2	-
Jamy ustnej	4	-
Żołądka	7	-
Jelita cienkiego	4	1
Jelita grubego	11	3
Wątroby	7	1
Trzustki	2	-
Prostaty	6	-
Gruzołu mlekowego	4	3

Źródło: [Yang C.S. et al. 2007]

Regularne spożywanie herbaty zielonej może również przyczynić się do zmniejszenia zachorowalności na choroby sercowo-naczyniowe [Cooper et al. 2005a, Peters et al. 2001, Riemersma et al. 2001]. Badania przeprowadzone w Japonii, wykazały, że dzienna konsumpcja herbaty, w ilości nie mniejszej niż 10 filiżanek, zmniejsza ryzyko śmierci z powodu chorób serca o 58% w stosunku do osób spożywających maksymalnie 3 filiżanki herbaty zielonej dziennie [Cooper et al. 2005a]. Z kolei według Peters'a i współpracowników [2001] wystarczy regularnie pić 3 filiżanki herbaty by zmniejszyć ryzyko wystąpienia zawału serca o 11%. Jednakże mimo tak wielu dowodów na korzystny wpływ herbaty zielonej na ludzkie zdrowie wciąż brak satysfakcjonujących wyników badań klinicznych.

Spośród szeregu pro-zdrowotnych właściwości, jakie posiada herbata zielona, na uwagę zasługują również jej właściwości przeciwwzapalne, przeciwbakteryjne (przeciwko *Escherichia coli*, *Streptococcus salivarius* i *Streptococcus mutant* oraz groźnej *Helicobacter*

pylori) oraz przeciwwirusowe. Dzięki tym właściwościom znajduje ona zastosowanie w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, w ochronie przeciwko próchnicy i zaburzeniom jelit oraz wirusowi grypy i wirusowi HIV [Cabrera et al. 2006, Mabe et al. 1999, Song et al. 2005, Yamaguchi et al. 2002]. Udowodniono również, że herbata zielona posiada właściwości antybiotykowe przeciwko patogenowi *Stenotrophomonas maltophilia* będącemu przyczyną zapalenia płuc, otrzewnej, wsierdza i/lub opon mózgowych [Navarro-Martinez et al. 2005]. Regularna konsumpcja herbaty zielonej może także wspomagać walkę z otyłością i cukrzycą [Hsu et al. 2008, Kao et al. 2006] oraz zapobiegać osteoporozie poprzez pozytywny wpływ na gospodarkę mineralną kości [Vali et al. 2007]. W ostatnich latach prowadzi się szeroko zakrojone badania nad wykorzystaniem herbaty zielonej w ochronie organizmu przed chorobami neurodegeneracyjnymi takimi jak np. choroba Parkinsona oraz/lub w leczeniu tych chorób [Pan et al. 2003].

Biorąc pod uwagę dużą liczbę doniesień na temat pozytywnego wpływu spożywania herbaty na organizm człowieka nasuwa się pytanie: w czym tkwi sekret herbaty zielonej? Obecny stan wiedzy pozwala stwierdzić, że korzystny wpływ herbaty zielonej jest wynikiem jej unikalnego zestawu składników chemicznych, z których 30-50% daje się ekstrahować do naparu herbacianego [Cichoń & Wierciak 2000].

2. Skład chemiczny herbaty zielonej

Skład chemiczny herbaty budził zainteresowanie naukowców od dziesiątków lat, lecz dopiero rozwój technik instrumentalnych pozwolił na dokładną identyfikację jej składników. W IX wieku uważano, że herbata składa się z pięciu podstawowych składników. Obecnie wiadomo, że w skład herbaty wchodzi ponad dziesięć grup związków. Ich ilość w herbacie jest w dużym stopniu uzależniona od wieku i jakości krzewu herbacianego oraz procesu produkcyjnego herbaty [Cichoń & Wierciak 2000, Graham 1992].

Głównymi składnikami świeżych liści herbaty są związki polifenolowe (głównie katechiny) i kwasy fenolowe oraz węglowodany (w tym błonnik), białka, aminokwasy i tłuszcze (tabela 3). Ponadto herbata zawiera pigmenty, związki lotne i mineralne oraz witaminy [Belitz et al. 2004, Graham 1992].

Procentowy udział poszczególnych składników świeżych liści herbaty nie jest jednak stały, lecz zależy od wielu czynników, takich jak np. gleba czy warunki klimatyczne. Ponadto wiek rośliny, czas zbioru oraz rodzaj liści herbacianych także wpływają na zawartość,

szczególnie olejków eterycznych i związków polifenolowych (głównie katechin) [Belitz et al. 2004]. Najbardziej delikatne herbaty o bogatym aromacie i dużej liczbie ekstrahowanych do naparu substancji (m.in. katechin) zawierają młode listki lub tipsy, czyli nierozwinięte pączki liści, pochodzące z wiosennego zbioru. Im starsze liście, tym mniejsza zawartość substancji, które przechodzą do naparu i tym gorszy smak herbaty.

Tabela 3. Skład chemiczny świeżych liści herbaty i herbaty zielonej oraz herbaty czarnej. Zawartość poszczególnych składników wyrażona jako % suchej masy

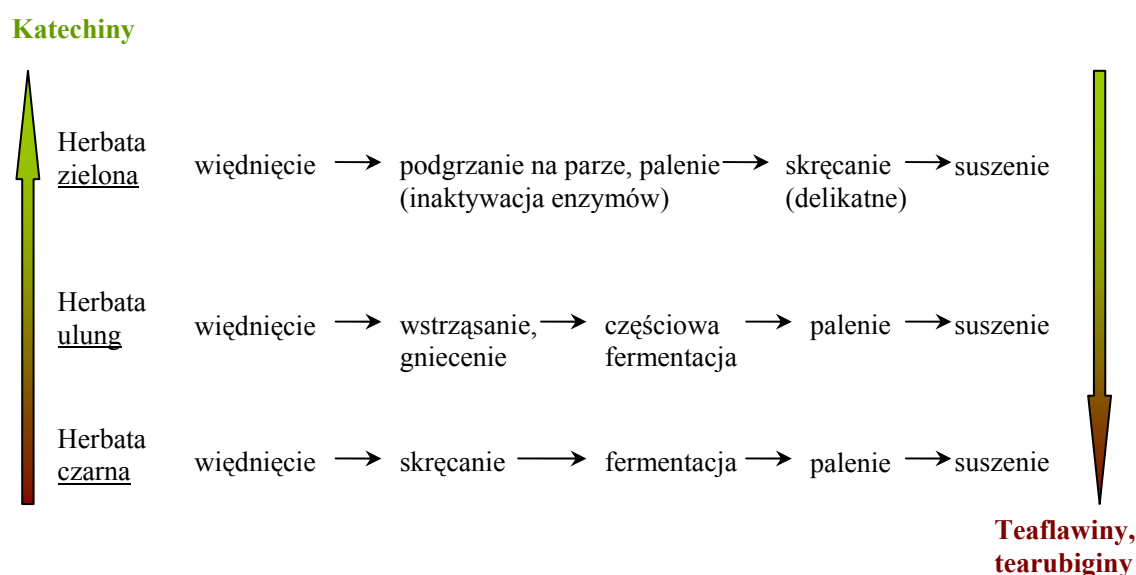
Składniki	Świeże liście/ herbata zielona	Czarna herbata
Związki polifenolowe		
Flawonoidy: głównie katechiny ponadto flawonole, flawony, oraz kwasy fenolowe i proantocyjanidyny	30 – 36	5
Tearubiginy i teaflawiny	0	25
Białka	15	15
Aminokwasy	4	4
Węglowodany (w tym frakcja błonnika)	33	33
Tłuszcze	2 – 7	2,5 – 7
Alkaloidy (kofeina)	4	4
Pigmenty (chlorofil i karotenoidy)	0,5 – 2	2
Związki lotne	0,1	0,1
Związki mineralne	5	5

Źródło: [Belitz et al. 2004, Łuczaj & Skrzydlewska 2005]

Na rynku dostępnych jest ponad 300 gatunków herbat [Ho et al. 2007]. Wszystkie wywodzą się z rośliny należącej do rodzaju *Thea Camellia*, występującej w dwóch podstawowych odmianach botanicznych *Camellia sinensis* var *sinensis* (chiński krzew herbaciany) oraz *Camellia sinensis* var *assamica* (indyjskie drzewo herbaciane) [Waszkiewicz-Robak 2003, Hara 2001]. Sposób obróbki technologicznej świeżych liści herbaty, a dokładniej stopień ich fermentacji, pozwala zaklasyfikować herbaty do jednego z trzech podstawowych rodzajów:

- herbaty zielonej – niefermentowanej,
- herbaty czerwonej (ulung) – półfermentowanej lub niedofermentowanej,
- herbaty czarnej – fermentowanej.

Podczas fermentacji świeżych liści herbaty zachodzą procesy utleniania jej podstawowych składników (katechin), w wyniku których powstają teaflawiny, a następnie jako produkty polimeryzacji tych ostatnich tearubiginy, nadające herbacie czarnej charakterystyczny aromat (rysunek 1).



Rysunek 1. Wpływ procesu obróbki herbaty na zawartość związków polifenolowych

Pomimo różnic w procesie produkcji sumaryczna ilość związków polifenolowych pozostaje niezmienną. Zarówno herbata czarna, jak i zielona zawierają około 25–40% związków polifenolowych w przeliczeniu na suchą masę [Belitz et al. 2004, Ho et al. 2007]. Jednakże związki polifenolowe występujące w herbacie czarnej to głównie tearubiginy (>20%) i teaflawiny (2–6%), katechiny stanowią zaledwie 3–10% (tabela 3) [Ho et al. 2007, Landau et al. 2005].

Skład herbaty zielonej jest bardzo zbliżony do składu świeżych liści herbaty (tabela 3) [Belitz et al. 2004, Cichoń & Wierciak 2005, Graham 1992, Waszkiewicz-Robak 2003]. Enzymy powodujące utlenianie katechin, takie jak oksydaza polifenolowa, zostają unieczynnione podczas podgrzewania liści, dlatego spośród średnio 30% związków polifenolowych obecnych w herbacie zielonej katechiny stanowią 60–90%. Głównymi katechinami herbaty zielonej są katechyna, epikatechyna, galokatechyna, epigalokatechyna, galusan epikatechiny oraz galusan epigalokatechiny, stanowiący około 50% zawartości

wszystkich katechin w herbacie (tabela 4). Powszechnie uważa się, że to właśnie duża zawartość katechin, charakteryzujących się wysoką aktywnością przeciwutleniającą, decyduje przede wszystkim o właściwościach zdrowotnych herbaty zielonej [Salah et al. 1995].

Tabela 4. Związki polifenolowe herbaty zielonej. Zawartość wyrażona jako % suchej masy liści

Związki polifenolowe	Zawartość (% suchej masy)
Flawonoidy	
Katechiny (Flawan-3-ole):	~30
Katechina	1–2
Epikatechina	1–3
Galokatechina	3–4
Epigalokatechina	3–6
Galusa epikatechiny	3–6
Galusan epigalokatechiny	9–13
Leukoantocyjany (Flawan-3,4-diole)	2–3
Flawonole:	ślady
Kwercetyna	
Mirycetyna,	
Kampferol	
Kwasy fenolowe i taniny hydrolizujące (m.in. kwas galusowy i jego estry)	~5
Proantocyjanidyny (taniny skondensowane)	~3

Źródło: [Belitz et al. 2004, Waszkiewicz-Robak 2003]

Zawartość pozostałych związków polifenolowych w herbacie zielonej jest stosunkowo niska i stanowi zaledwie kilka do kilkunastu procent [Belitz et al. 2004]. Spośród związków polifenolowych herbaty poza katechinami wymienić można leukoantocyjany (flawan-3,4-diole), flawonole, głównie kwercetynę, mirycetynę i kampferol, występujące jednak w śladowych ilościach, kwasy fenolowe np. kwas galusowy i taniny hydrolizujące, czyli estry kwasu galusowego z monosacharydami oraz proantocyjanidyny (taniny skondensowane).

Proantocyjanidyny występujące w herbacie mają duży wpływ na walory sensoryczne naparu herbaty. Nadają one herbatom charakterystyczny gorzkawy i ściągający smak, co jest wynikiem ich zdolności do wiązania bogatych w prolinę białek śliny. Ponadto taniny wiążą kofeinę, przez co długo parzona herbata zielona nabiera właściwości uspokajających

i kojących, szczególnie na błonę śluzową żołądka. Dzięki specyficznym właściwościom tanin herbata zielona stosowana była dawniej jako lek przeciwbiegunkowy i przeciwzapalny. Niestety obecność tych związków w herbacie może również powodować niekorzystny efekt, jakim jest ograniczenie wchłaniania niektórych metali, takich jak żelazo, wapń czy magnez [Cichoń & Wierciak 2005, Waszkiewicz-Robak 2003, Wilska-Jeszka 2002].

Biorąc pod uwagę wpływ herbaty zielonej na organizm człowieka, ważnym jej składnikiem, poza katechinami, o których będzie mowa w dalszej części pracy, są również alkaloidy purynowe takie jak kofeina, teofilina i teobromina [Cichoń & Wierciak 2005, Waszkiewicz-Robak 2003]. Kofeina działa orzeźwiająco i wzmacniająco, poza tym może stymulować proces termogenezy w organizmie, a więc wspomagać odchudzanie [Cooper et al. 2005a]. Teofilina i teobromina wpływają pozytywnie na układ krwionośny i moczowy. Najbardziej aktywnym alkaloidem jest kofeina, która w herbacie zwana jest także teiną, aczkolwiek obecnie coraz częściej używa się tej pierwszej nazwy.

Herbata jako roślina ma zdolność pobierania z gleby różnych substancji, stąd między innymi obecność w herbacie związków mineralnych. Do mikroelementów herbaty należą potas (powyżej 50% wszystkich związków mineralnych herbaty), wapń, magnez, żelazo i miedź. Większość z nich przechodzi do naparu, gdyż wchodzi w skład rozpuszczalnych w wodzie związków koloidalnych. Warto podkreślić, że herbata zielona stanowi źródło jodu, fosforu i fluoru. Ilości tych pierwiastków są w herbacie śladowe, jednak wystarczające do uzupełnienia potrzeb organizmu. Obecność fluoru w herbacie zielonej prawdopodobnie przyczynia się do właściwości przeciwpróchniczych herbaty [Cichoń & Wierciak 2005, Waszkiewicz-Robak 2003].

Herbata zielona zawiera również witaminy, chociaż, ze względu na ilość herbaty używanej do przygotowania naparu, są to ilości nieistotne pod względem żywieniowym [Waszkiewicz-Robak 2003]. Najczęściej występującymi witaminy są: prowitamina A, witamina C, witaminy z grupy B i witamina K.

O charakterystycznych cechach sensorycznych herbaty zielonej decydują, poza związkami polifenolowymi, również związki o małej masie cząsteczkowej. Należą do nich aminokwasy, które powstają głównie podczas obróbki świeżych liści herbaty, a pod wpływem wysokiej temperatury tworzą aldehydy kształtując w ten sposób aromat herbaty zielonej. Najwięcej, bo aż 50% wszystkich aminokwasów stanowi teanina, pozostałe aminokwasy to kwas glutaminowy, arginina, kwas aspartamowy czy też alanina.

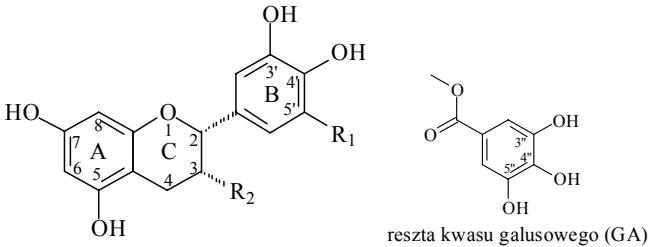
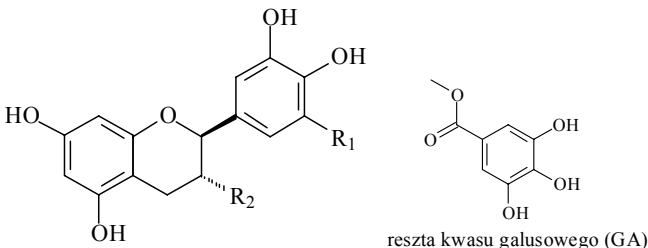
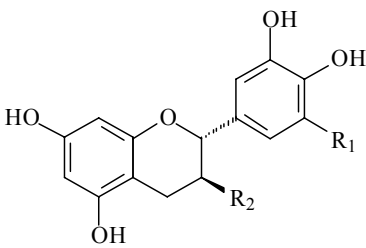
Ponadto herbata zielona zawiera białka, wśród których większość to enzymy oraz węglowodany, w tym nierozpuszczalna frakcja błonnika, tłuszcze, pigmenty i olejki eteryczne [Cichoń & Wierciak 2005, Waszkiewicz-Robak 2003].

Rozdział II. Katechiny

3. Struktura chemiczna katechin

Katechiny (flawan-3-ole) należą do dużej grupy związków polifenolowych zwanych flawonoidami. Charakterystyczną cechą struktury flawonoidów jest szkielet difenylpropanoidowy ($C_6C_3C_6$), w którym dwa pierścienie aromatyczne połączone są heterocyklicznym pierścieniem γ -piranowym o różnym stopniu utlenienia. Katechiny wyróżniają się wśród flawonoidów nasyconym, o najwyższym stopniu utlenienia, pierścieniem heterocyklicznym oraz brakiem grupy karbonylowej w pozycji C4 (tabela 5).

Tabela 5. Struktury chemiczne katechin herbaty zielonej wraz z oznaczeniem konfiguracji przestrzennej

Konfiguracja	Struktura chemiczna	Nazwa katechiny
(2R,3R)		(-)-epikatechina $R_1:H, R_2:OH$ (-)-epigalokatechina $R_1:OH, R_2:OH$ galusan (-)-epikatechiny $R_1:H, R_2:GA$ galusan (-)-epigalokatechiny $R_1:OH, R_2:GA$
(2S,3R)		(-)-katechina $R_1:H, R_2:OH$ (-)-galokatechina $R_1:OH, R_2:OH$ galusan (-)-katechiny $R_1:H, R_2:GA$ galusan (-)-galokatechiny $R_1:OH, R_2:GA$
(2R,3S)		(+)-katechina $R_1:H, R_2:OH$ (+)-galokatechina $R_1:OH, R_2:OH$

Liczne grupy hydroksylowe w cząsteczce katechiny tworzą charakterystyczne ugrupowania: katecholowe (dwie grupy OH w pierścieniu B w pozycjach C3' i C4') lub pyrogalolowe (trzy grupy OH w pierścieniu B w pozycjach C3', C4' i C5'). Katechiny posiadające ugrupowanie pyrogalolowe nazywane są galokatechinami. W odróżnieniu od innych flawonoidów katechiny są dobrze rozpuszczalne w wodzie i nie tworzą glikozydów, mogą jednak występować w postaci galusanów (tabela 5). Ponadto w cząsteczce flawan-3-oli występują dwa centra asymetrii przy atomach węgla C2 i C3, stąd cząsteczki różnią się między sobą także konfiguracją. Wśród katechin wyróżniamy więc enancjomery takie jak np. (+)-katechina i (-)-katechina mające różną zdolność skręcania płaszczyzny polaryzacji światła oraz epimery takie jak np. (-)-katechina lub (+)-katechina i (-)-epikatechina różniące się konfiguracją jedynie przy jednym z dwóch asymetrycznych atomów węgla (tabela 5) [Beecher 2003, Wilska-Jeszka 2002].

4. Występowanie katechin w produktach spożywczych

Pierwsze wyizolowane i zidentyfikowane w latach 1927-1935 katechiny pochodziły z zielonej herbaty, która jest ich najbogatszym źródłem [Hara 2001]. Katechiny występują również w owocach, warzywach, nasionach i napojach, chociaż w owocach i nasionach bardziej powszechne od katechin są ich oligo- i polimery [Arts I. et al. 2000a, b; Beecher 2003, Wilska-Jeszka 2002]. Zawartość katechin w owocach waha się w granicach 10-250 mg/kg i uzależniona jest od gatunku, odmiany i stopnia dojrzałości owocu (tabela 6).

Dobrym źródłem katechin są ziarna kakaowca i produkowana z nich gorzka czekolada, która może zawierać nawet 610 mg katechin/kg. Wysoką zawartość katechin posiadają także ziarna bobu (po obróbce kulinarnej 206,3 mg/kg) [Arts I et al. 2000a]. Katechiny występują również w czerwonym winie w ilości 27–96 mg/l oraz w herbacie czarnej w ilości 418 mg/l (41,8 mg/g liści) [Arts I. et al. 2000b]. Najbogatszym źródłem katechin jest jednak herbata zielona, której jeden litr naparu może zawierać 870–2200 mg katechin (59–103 mg/g liści) [Henning et al. 2003].

Ze względu na rozpowszechnienie w owocach, warzywach i nasionach oraz ich przetworach, katechiny są ważnym składnikiem ludzkiej diety. Obecnie szacuje się, że ilość spożywanych z codzienną dietą flawonoidów wynosi średnio 189,7 mg, z czego aż 83,5% stanowią flawan-3-ole (katechiny), flawanony zaledwie 7,6%, flawonole 6,8%, a antocyjany 1,6% [Chun et al. 2007]. Głównym źródłem flawonoidów w Stanach Zjednoczonych są:

herbata (157 mg), soki owocowe (8 mg), wino (4 mg) i owoce (3 mg). W Danii spożycie katechin wynosi średnio 20 mg – 50 mg dziennie [Dragsted et al. 1997], podobne wyniki dają badania przeprowadzone w Holandii, gdzie oszacowano, że katechiny spożywane są w ilości 50 mg dziennie [Arts I. et al. 2001]. Głównym źródłem katechin w codziennej diecie Holendrów są herbata, czekolada, jabłka i śliwki [Arts I. et al. 2000a, b].

Tabela 6. Zawartość katechin (głównie (+)-katechiny i (-)-epikatechiny) w wybranych owocach

Owoce	Katechiny [mg/kg]
Jabłka	50 – 120
Gruszki	20 – 39
Śliwki	20,5 – 62
Morele	110 – 250
Truskawki	30 – 100
Czarne porzeczki	50 – 90
Czarny bez	210,3
Jeżyny	190
Agrest	204
Kiwi	4,5

Źródło: [Arts I. et al. 2000a, Wilska-Jeszka 2002]

5. Właściwości biologiczne katechin występujących w herbacie zielonej

Odkrycie związków polifenolowych, nazwanych początkowo witaminą P, uhonorowane w 1937 r. nagrodą Nobla, zapoczątkowało szereg badań nad właściwościami biologicznymi tych związków oraz produktów bogatych w polifenole. Katechiny, obok flawonoli, należą do grupy najintensywniej badanych polifenoli.

Flawan-3-ole, tak jak inne związki polifenolowe, są wtórnymi metabolitami roślin, pełniącymi w nich istotne funkcje biologiczne:

- odstrasza żerujące organizmy i chronią przed szkodliwymi drobnoustrojami,
- umożliwiają regulację ciśnienia osmotycznego w czasie suszy,
- chronią przed promieniowaniem UV,

- pełnią funkcję atraktantów wabiąc owady zapylające i zwierzęta przenoszące nasiona,
- chronią roślinę przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu generowanych w procesie fotosyntezy.

Katechiny, ze względu na ich rozpowszechnienie, są ważnym naturalnym składnikiem diety człowieka. W organizmie również pełnią wiele istotnych funkcji biologicznych. Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że katechiny mogą regulować wzrost komórek rakowych poprzez oddziaływanie między innymi z epidermalnym czynnikiem wzrostu (EGF – ang. *Epidermal Growth Factor*). Katechiny zapobiegają przemianie nieaktywnych form karcynogenu w formy aktywne. Pozytywnie wpływają na funkcjonowanie układu odpornościowego oraz posiadają właściwości przeciwzapalne. Dzięki właściwościom przeciwbakteryjnym zapobiegają rozwojowi próchnicy. Katechiny mogą również modulować gospodarkę mineralną organizmu wpływając na gęstość kości, co wykorzystuje się w leczeniu osteoporozy. Przeciwwirusowe właściwości katechin mogą chronić organizm przed wirusem HIV oraz grypą. Odgrywają istotną rolę w walce z otyłością, wspomagając proces termogenezy poprzez interakcje z kofeiną oraz hamowanie aktywności metylotransferazy katecholowej – enzymu rozkładającego norepinefrynę. Katechiny wspomagają również działanie wielu leków stosowanych w terapii choroby Parkinsona (Lewadopa) i chemoterapii (tamoksifen). Hamują biosyntezę cholesterolu poprzez hamowanie enzymu epoksydazy skwalenowej. Zmniejszają stymulowaną epinefryną agregację krwinek płytkowych [Cooper et al. 2005a, b, Higdon & Frei 2003, Ignatowicz 2007].

Szerokie spektrum właściwości biologicznych katechin (między innymi przeciwnowotworowe, przeciwmutagenne, przeciwzapalne) tłumaczy się często ich aktywnością przeciwutleniającą, chociaż niektóre badania dowodzą istnienia mechanizmów odbiegających od powszechnie pojmowanego działania przeciwutleniającego katechin w zapobieganiu oraz/lub leczeniu chorób. Coraz częściej zwraca się uwagę na funkcję katechin jako cząsteczek sygnalizujących oraz modulatorów odpowiedzi komórkowej w wyniku oddziaływań ze specyficznymi kinazami [Williams et al. 2004].

W niektórych przypadkach przeciwutleniacze, jakimi są katechiny, mogą wykazywać aktywność proutleniającą, powszechnie uznawaną za potencjalnie niekorzystną dla ludzkiego organizmu [Elbling et al. 2005]. Jednakże, w organizmie katechiny, dzięki właściwościom proutleniającym mogą również odgrywać pozytywną rolę. Indukowany przez związki polifenolowe stres oksydacyjny, uznawany dotychczas za objaw lub przyczynę występowania stanów patologicznych organizmu, może wzmacniać obronę komórki przed toksycznym

działaniem ksenobiotyków i związków elektrofilowych poprzez aktywację genów kodujących enzymy II fazy biotransformacji [Halliwell 2008, Williams et al. 2004].

5.1. Właściwości przeciwutleniające katechin

Reaktywne formy tlenu (RFT), czyli wolne rodniki tlenowe i formy nierodnikowe tlenu, takie jak np. nadtlenuk wodoru, odgrywają istotną rolę w patogenezie wielu chorób cywilizacyjnych, nękających współczesne społeczeństwo [Bartosz 2003, Duda-Chodak & Tuszyński 2007, Halliwell & Gutteridge 2007]. Wytwarzane endogennie, jak i pod wpływem czynników egzogennych RFT mogą reagować z makrocząsteczkami komórek, prowadząc do zmiany ich struktury i zaburzenia pełnionych przez nie funkcji, a w konsekwencji do stanów chorobowych. Oddziaływanie RFT ze strukturami komórkowymi, takimi jak tłuszcze, białka, aminokwasy, kwasy nukleinowe i cukrowce, przedstawione zostało wyczerpująco w pracach przeglądowych poświęconych tej tematyce [Bartosz 2003, Duda-Chodak & Tuszyński 2007].

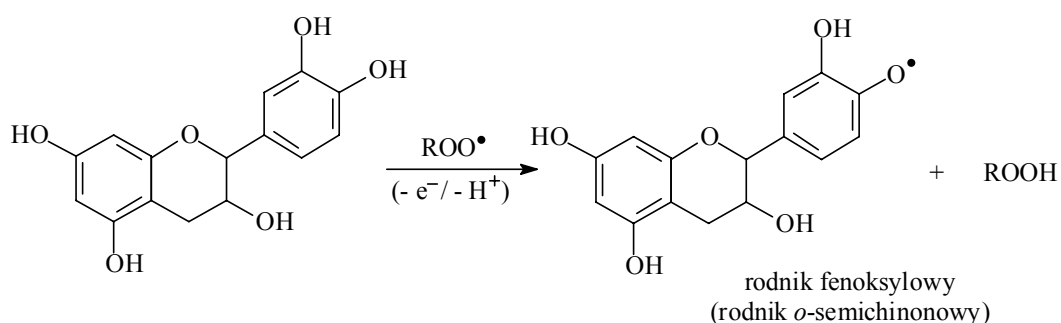
Organizm ludzki dążąc do zachowania równowagi oksydacyjno-redukcyjnej wykształcił wiele mechanizmów ochronnych przed szkodliwym działaniem RFT, takich jak enzymy przeciwutleniające (np. katalaza lub dysmutaza ponadtlenkowa), przeciwutleniacze niskocząsteczkowe (np. glutation i kwas moczowy), czy białka szoku cieplnego. Nie zawsze jednak endogenne systemy przeciwutleniające mogą utrzymać RFT na odpowiednim, fizjologicznym poziomie [Bartosz 2003]. Dlatego istotne jest dostarczanie organizmowi przeciwutleniaczy egzogennych, takich jak np. związki polifenolowe (w tym katechiny), których bogatym źródłem jest codzienna dieta.

5.1.1. Mechanizmy działania przeciwutleniającego katechin

Do klasycznego działania przeciwutleniającego katechin, opartego na ich właściwościach redukujących należą: 1) bezpośrednie unieczynnianie (tzw. zmiatanie) reaktywnych form tlenu i azotu (RFT i RFA), oraz 2) zmniejszanie ilości powstających RFT i/lub RFA pośrednio poprzez: a) regenerację innych przeciwutleniaczy takich jak α - tokoferol czy β -karoten i b) chelatowanie metali przejściowych.

Katechiny posiadają silne właściwości przeciwutleniające ze względu na swoją budowę chemiczną warunkującą zdolność do łatwego oddawania atomów wodoru i/lub

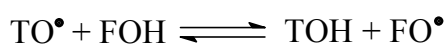
elektronów. W wyniku reakcji katechiny z rodnikiem np. nadtlennym (ROO^\bullet) następuje przeniesienie atomu wodoru i/lub elektronu na cząsteczkę rodnika z utworzeniem formy nierodnikowej (ROOH) oraz rodnika fenoksyłowego (rodnik *o*-semichinonowy) katechiny (rysunek 2).



Rysunek 2. Mechanizm przeciwutleniającego działania flawonoidów na przykładzie zmiatania rodników nadtlennych (ROO^\bullet) przez katechinę

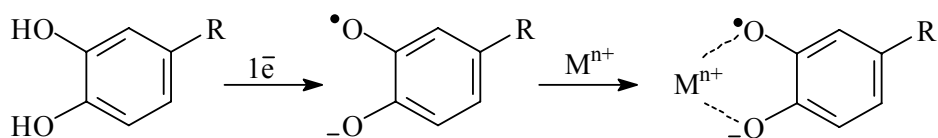
Powstałe rodniki fenoksyłowe są bardziej stabilne niż rodniki tlenowe, co czyni je bezpieczniejszymi dla organizmu. Ponadto rodniki fenoksyłowe katechin mogą w kolejnych etapach uczestniczyć w reakcjach charakterystycznych dla rodników, takich jak dimeryzacja lub reakcje z innymi rodnikami, mogą też ulegać dalszemu utlenieniu do formy *o*-chinonowej. Niektórzy autorzy twierdzą, że, w odróżnieniu od flawonoli, reakcje rodników semichinonowych katechin prowadzące do powstania związków oligomerycznych w wyniku addycji nukleofilowej są bardziej uprzywilejowane niż dalsze ich utlenianie do *o*-chinonów [Aron & Kennedy 2008].

Katechiny, dzięki właściwościom redukcyjnym, mogą również regenerować inne przeciwutleniacze takie jak α -tokoferol czy β -karoten [Lotito & Fraga 2000, Zhou et al. 2005]. Mechanizm regeneracji, na przykładzie tokoferolu, polega na oddaniu atomu wodoru i/lub elektronu przez katechinę (FOH) cząsteczce rodnika tokoferylowego (TO^\bullet), w wyniku czego następuje utworzenie tokoferolu (TOH) i rodnika fenoksyłowego katechiny (FO^\bullet), według schematu reakcji:



Jak wykazały badania Jovanovic'a i współpracowników [1995] nad właściwościami przeciwutleniającymi katechin, powyższa reakcja jest możliwa, ponieważ potencjały redukcji katechin (0,43 V) są niższe niż potencjał redukcji tokoferolu (0,48 V). Może zatem nastąpić przeniesienie elektronu oraz towarzyszącego mu protonu i ładunku elektrostatycznego z cząsteczki katechiny na rodnik tokoferylowy i odbudowa α -tokoferolu [Jovanovic et al. 1998]. Podobny mechanizm sugeruje się dla ochrony β -karotenu. W przypadku pary przeciwutleniaczy: katechiny i kwas askorbinowy obserwuje się ochronny efekt kwasu askorbinowego wobec katechin. Kwas askorbinowy ma niższy potencjał redukcji (0,28 V) niż katechiny dlatego możliwe jest przeniesienie elektronu z jego cząsteczki na rodnik fenoksyłowy i regeneracja katechiny [Lotito & Fraga 2000].

Mechanizm chelatowania metali przez katechiny polega na tworzeniu kompleksów pomiędzy elektrono-donorowymi cząsteczkami katechin a jonami metali z nieobsadzoną powłoką walencyjną. Potencjalnym miejscem chelatowania metali w cząsteczce flawan-3-olu jest grupa katecholowa pierścienia B lub reszta kwasu galusowego. Mechanizm reakcji jest następujący: oderwanie atomu wodoru w wyniku utleniania cząsteczki katechiny prowadzi do powstania rodnika fenoksyłowego, który w obecności jonu metalu tworzy z nim kompleks (rysunek 3) [Morel et al. 1998].



Rysunek 3. Mechanizm chelatowania jonów metali przejściowych przez ugrupowanie katecholowe katechin

Oprócz klasycznego działania przeciwutleniającego, katechiny mogą pełnić rolę przeciwutleniaczy, wpływając na wewnątrzkomórkową równowagę redoks, dzięki innym mechanizmom: 1) inhibicji enzymów „proutleniających”, takich jak syntaza tlenu azotu czy lipooksygenaza, 2) indukcji ekspresji genów kodujących enzymy I i II fazy biotransformacji takich jak np. S-transferaza glutationowa i/lub 3) hamowaniu aktywacji czynników transkrypcyjnych, takich jak np. czynnik jądrowy kappa B (NF- κ B – ang. *Nuclear factor- κ B*) [Frei & Higdon 2003, Rice-Evans et al. 1996]. Najnowsze badania wskazują na istotną rolę katechin jako cząsteczek sygnalizujących, czyli modulatorów odpowiedzi komórkowej,

między innymi poprzez interakcje z kinazami aktywowanymi mitogenami (MAPK – ang. *Mitogen Activated Protein Kinases*) [Stevenson & Hurst 2007, Williams et al. 2004].

5.1.2. Czynniki fizyko-chemiczne wpływające na aktywność przeciwutleniającą katechin

Na podstawie wyników badań *in vitro* stwierdzono, że katechiny herbaty zielonej mogą wychwytywać i neutralizować zarówno wolne rodniki, jak i RFT i/lub RFA, takie jak anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$), tlen singletowy (1O_2), tlenek azotu (NO), nadtlenoazotyn ($ONOO^-$), rodnik nadtlenkowy ($ROO\cdot$), kwas chlorowy I (HOCl), działając jako przeciwutleniacze prewentywne i interwentywne [Kawai et al. 2008, Kondo et al. 1999, Pannala et al. 1997, Paquay et al. 2000, Rice-Evans et al. 1996].

Wyniki badań nad aktywnością przeciwutleniającą katechin wyznaczoną za pomocą różnych testów *in vitro* wykazały, że katechiny są najbardziej skutecznymi przeciwutleniaczami spośród związków polifenolowych i witamin przeciwutleniających (tabela 7).

Tabela 7. Aktywność przeciwutleniająca *in vitro* wybranych katechin oraz dla porównania flawonoli, kwasu galusowego, α -tokoferolu i/lub witaminy C wyrażona jako zdolność zmiatania rodnika $ABTS^{\cdot+}$ (metoda TEAC) ^(a), $O_2^{\cdot-}$ (radioliza pulsacyjna) ^(b, c), 1O_2 (fotoliza laserowa) ^(b), HOCl ^(d), $ONOO^-$ ^(e)

Związek	TEAC (mM) ^a pH 7,4	$k(O_2^{\cdot-} + F)^b$ $\times 10^5 M^{-1}s^{-1}$	$k(^1O_2 + F)^b$ $\times 10^7 M^{-1}s^{-1}$	$I_{HOCl}(\%)^d$ pH 7,4	$I_{ONOO^-}(\%)^e$ pH 7
Galusan epigalokatechiny	4,8	7,3	22	81	32
Galusan epikatechiny	4,9	4,3	22	80	38
Epigalokatechina	3,8	4,1	11	73	20
Kwercytyna	4,7	0,47	0,24	60	-
Rutyna	2,4	0,51	0,16	-	-
Kwas galusowy	3,0	3,4	-	-	32
α -Tokoferol	1,0	0,058 ^c	5	4	14
Witamina C	0,9	-	-	-	-

^a [Rice-Evans et al. 1996], ^b [Jovanovic et al. 1998], ^c [Jovanovic et al. 1994]; ^d [Kawai et al. 2008]; ^e [Pannala et al. 1997]; Oznaczenia: F – flawonoid; $I_{HOCl}(\%)$ – stopień hamowania (%) powstawania produktów reakcji HOCl z deoksytydyną w wyniku zmiatania HOCl przez 100 μM przeciwutleniacz; I_{ONOO^-} – stopień hamowania powstawania produktów reakcji $ONOO^-$ z tyrozyną w wyniku zmiatania $ONOO^-$ przez 10 μM przeciwutleniacz

Wysoka aktywność przeciwutleniającą katechin w dużym stopniu zależy od ich budowy chemicznej oraz środowiska, w którym działają.

Wpływ struktury katechin

Na podstawie wyników badań nad aktywnością antyoksydacyjną flawonoidów wykazano, że aktywność tych związków zależy od występowania w ich cząsteczkach specyficznych ugrupowań strukturalnych [Rice-Evans et al. 1996]. Do najważniejszych elementów struktury, determinujących właściwości przeciwutleniające flawonoidów należą:

- 1) ugrupowanie katecholowe (3'-OH, 4'-OH) w pierścieniu B,
- 2) podwójne wiązanie pomiędzy atomami węgla w pozycji C2 i C3 w połączeniu z grupą karbonylową w pozycji C4 w pierścieniu C oraz
- 3) dwie grupy hydroksylowe w pozycjach C5 i C7 (pierścienie A i C).

Taka budowa związku umożliwia delokalizację elektronów pomiędzy pierścieniami A i B, co stabilizuje rodnik fenoksyłowy powstały w wyniku oddania elektronu/atomu wodoru przez cząsteczkę np. flawonolu.

W strukturze katechin brak grupy karbonylowej w pozycji C4, ponadto pierścień heterocykliczny jest nasycony (tabela 5), dlatego delokalizacja elektronów pomiędzy pierścieniami A i B, w powstałym rodniku fenoksyłowym, jest niemożliwa.

Właściwości przeciwutleniające katechin zależą więc w dużym stopniu od liczby grup hydroksylowych w cząsteczce. Stwierdzono, że im większa **liczba podstawników hydroksylowych** tym wyższa aktywność przeciwutleniająca katechin [Rice-Evans et al. 1996].

Wyniki badań nad aktywnością przeciwutleniającą katechin *in vitro* (zebrane w tabeli 8) wskazują, że najwyższą aktywnością przeciwutleniającą spośród katechin charakteryzują się ich galusany, przy czym najbardziej skutecznym zmiataczem wolnych rodników jest galusan epigalokatechiny, posiadający osiem grup hydroksylowych w cząsteczce. Aktywność katechin rośnie wraz ze wzrostem liczby grup OH w cząsteczce. Katechina i epikatechina, posiadające najmniej, bo tylko 5 grup OH, charakteryzują się najczęściej najniższą aktywnością przeciwutleniającą.

Tabela 8. Aktywność przeciwutleniająca katechin *in vitro*

Model/Metoda badania	Wynik*	Literatura
Zdolność zmiatania ABTS ^{•+} w teście TEAC (pH 7,4)	ECG≥EGCG>EGC>EC≥C	[Rice-Evans et al. 1996]
Zdolność zmiatania DPPH [•] /metoda ESR	EGCG=GCG=ECG≥CG>EGC≥GC>C=EC	[Nanjo et al. 1996]
Zdolność redukowania metali przejściowych/ metoda FRAP	Aktywność katechin – metoda FRAP: ECG≥CG>EGCG>EGC>GCG>GC>EC≥C	[Xu et al. 2004]
Zdolność zmiatania DPPH [•]	Aktywność katechin wobec DPPH [•] : EGCG=GCG≥ECG=CG≥EGC>EC>GC≥C	
Zdolność zmiatania O ₂ ^{•-} , ¹ O ₂ , DPPH [•] , i rodników generowanych przez AAPH	Aktywność katechin wobec każdego z badanych rodników: EGCG=GCG>EGC=GC>EC=C	[Guo et al. 1999]
Zdolność zmiatania O ₂ ^{•-} i [•] OH/metoda ESR	Aktywność katechin wobec O ₂ ^{•-} : EGCG>EGC>ECG> C=EC Aktywność katechin wobec [•] OH: EGCG= ECG>EC>C>EGC	[Nanjo et al. 1999]
Zdolność zmiatania O ₂ ^{•-}	EGCG=GCG=ECG>EGC=GC>EC=C	[Nakagawa & Yokozawa 2002]
Stopień hamowania peroksydacji lipidów (metoda FRAP)	EGCG>ECG>C>GC>EGC>EC	[Hashimoto et al. 2003]
Stopień hamowania peroksydacji lipidów w komórkach HepG2 (metoda TBARS)	EGCG>EGC≥ECG>EC	[Murakami et al. 2002]
Stopień hamowania peroksydacji lipidów w komórkach HepG2 wywołanej działaniem toksycznych dawek ołowiu (100 μM Pb ²⁺) / metoda TBARS	ECG>EGCG>EC>EGC	[Chen et al. 2002]
Stopień hamowania peroksydacji lipidów katalizowanej Fe ²⁺ , Cu ²⁺ lub V ³⁺ , w hepatocytach szczura/ metoda TBARS	(Fe ²⁺ , Cu ²⁺) ECG>EGC>EGC>EC (V ³⁺) EGCG>ECG> EC>EGC	[Sugihara et al. 2001]

* Oznaczenia: C - katechyna, EC - epikatechyna, EGC - epigalokatechyna, GC - galokatechyna, ECG - galusan epikatechiny, CG - galusan katechiny, EGCG - galusan epigalokatechiny, GCG - galusan galokatechiny

Stwierdzono również, że duży wpływ na aktywność przeciwutleniającą poza liczbą grup hydroksylowych ma ich rozmieszczenie. Badania Nanjo i współpracowników [1996] nad zdolnością katechin i ich form acetylowych lub glikozydowych do zmiatania rodników DPPH[•] wykazały, że hydroksylacja w pierścieniu A nie ma wpływu na aktywność przeciwutleniającą katechin. Ważny jest natomiast zarówno stopień, jak i miejsce hydroksylacji pierścienia B katechiny. Katechiny z grupą pyrogalolową charakteryzują się większym potencjałem przeciwutleniającym niż te z grupą katecholową. Znaczącym

elementem strukturalnym odpowiedzialnym za wysoką aktywność przeciwutleniającą katechin jest również reszta kwasu galusowego w pozycji C3. Nanjo i współpracownicy stwierdzili, że podstawienie atomu wodoru grupy 4'-OH w pierścieniu B galusanu epigalokatechiny grupą glukozylową nie wpływa zasadniczo na zmianę aktywności przeciwutleniającej badanego związku. Jednakże, gdy atomy wodorów grup 4'-OH i 4''-OH w cząsteczce galusanu epigalokatechiny zostaną podstawione grupami glukozyłowymi, aktywność przeciwutleniająca glukozyłowej pochodnej galusanu epigalokatechiny jest znacznie niższa niż związku macierzystego [Nanjo et al. 1996]. Reszta kwasu galusowego jest zatem kluczowym elementem strukturalnym, decydującym o aktywności przeciwutleniającej galusanów katechin.

Na podstawie wyników powyższych badań **charakterystyczne ugrupowania** obecne w cząsteczkach katechin można uszeregować pod względem ich udziału w całkowitej aktywności przeciwutleniającej związku według kolejności: reszta kwasu galusowego \geq grupa pyrogalolowa $>$ grupa katecholowa.

Wpływ struktury na aktywność przeciwutleniającą katechin można również analizować na podstawie wartości potencjałów utleniania katechin. Ponieważ reakcje elektrochemicznego utleniania, jak i mechanizm zmiatania wolnych rodników przez flawonoidy, polegają na rozerwaniu wiązania O-H, łatwość utleniania związku może odzwierciedlać jego zdolność do zmiatania rodników [van Acker et al. 1998, Firuzi et al. 2005, Pietta 2000]. Im niższy potencjał utleniania tym wyższa aktywność przeciwutleniająca flawonoidu, gdyż większa jest jego zdolność do oddawania elektronu [van Acker et al. 1998, Mukai et al. 2005, Yang et al. 2001]. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że wartości potencjałów utleniania katechin maleją wraz ze wzrostem liczby grup OH w cząsteczce katechiny. Najniższy potencjał utleniania, a więc najwyższą zdolność zmiatania RFT posiadają katechiny z resztą kwasu galusowego, następnie katechiny z grupą pyrogalolową i katecholową. Wyniki te potwierdzają, po raz kolejny, istotny wpływ struktury katechin na ich aktywność przeciwutleniającą.

W przypadku katechin można też rozważać wpływ konfiguracji przestrzennej cząsteczek katechin na ich aktywność przeciwutleniającą. Większość dotychczasowych badań nad aktywnością przeciwutleniającą katechin wykazuje brak różnic w aktywności pomiędzy odpowiednimi epimerami [Najno et al. 1996, Xu et al. 2004]. Jednakże badania Guo i współpracowników [1999] nad aktywnością przeciwutleniającą katechin wyrażoną jako zdolność zmiatania rodnika DPPH \cdot , rodników generowanych z AAPH oraz RFT, takich jak O $_2^{\cdot-}$ i 1 O $_2$, wykazują, że galusan galokatechiny i galokatechina mają większą zdolność

do zmiatania rodników w porównaniu do ich epimerów, ale tylko przy relatywnie niskich stężeniach (<0,1mM). Im wyższe stężenia katechin tym różnice w aktywności przeciwutleniającej pomiędzy odpowiednimi epimerami są mniejsze. Ponadto Guo wykazał, że przestrzenna budowa cząsteczki katechiny ma istotny wpływ na jej aktywność przeciwutleniającą w przypadku zmiatania dużych rodników, takich jak DPPH^{*}, co jest niezgodne z wynikami badań Nanjo i współpracowników [1996], którzy nie zaobserwowali istotnych różnic w aktywności przeciwutleniającej pomiędzy odpowiednimi epimerami katechin wobec rodnika DPPH^{*}.

Wpływ środowiska

W układach biologicznych katechiny działają w środowisku wodnym lub lipofilowym. Ze względu na różnice we właściwościach fizyko-chemicznych związków, takich jak polarność cząsteczek, czy rozpuszczalność w określonym środowisku, mechanizm działania przeciwutleniającego katechin może być różny, co znajduje odzwierciedlenie w wartościach parametrów charakteryzujących ich aktywność.

Na podstawie wyników badań nad aktywnością antyoksydacyjną katechin w środowiskach o różnej polarności, stwierdzono, że katechina i epikatechina, wykazują najniższą aktywność przeciwutleniającą spośród badanych katechin wobec rodników w środowisku wodnym (wyrażoną jako zdolność zmiatania rodników ABTS^{•+}), podczas gdy ich aktywność w środowisku lipofilowym (wyrażona jako zdolność hamowania utleniania LDL) jest większa od aktywności epigalokatechiny i zbliżona do aktywności galusanów katechin [Salah et al. 1995]. Ponieważ ochronny wpływ katechin wobec lipidów jest wynikiem lokalizacji katechin na powierzchni błon, przez co mogą one zmiatać wolne rodniki i zapobiegać konsumpcji α - tokoferolu – lipofilowego przeciwutleniacza, zaobserwowane różnice w zdolności poszczególnych katechin i kwasu galusowego do hamowania peroksydacji lipidów mogą wynikać z różnych współczynników podziału tych związków pomiędzy fazami lipidową i wodną [Salah et al. 1995, Yang et al. 2001]. Na przykład współczynnik podziału międzyfazowego (oktanol/woda) epigalokatechiny wynosi 0,12, podczas gdy współczynnik podziału epikatechiny 1,2 [Higdon & Frei 2003].

Porter i współpracownicy [1989] wskazują na istnienie zjawiska tzw. **paradoksu polarnego**, które ilustruje różne zachowanie się cząsteczek przeciwutleniaczy w środowisku lipofilowym, wodnym lub w emulsji. Porter zaobserwował, że przeciwutleniacze polarne są bardziej aktywne w środowisku jednofazowym (np. lipofilowym), natomiast

przeciwutleniacze niepolarne lub mniej polarne są skuteczniejsze w środowisku heterofazowym (np. emulsjach). Potwierdzeniem istnienia paradoksu polarnego są również wyniki badań zespołu Huang i Frankel [1997], które wskazują na większą skuteczność przeciwutleniającą herbaty zielonej w liposomach niż w emulsji oleju kukurydzianego. Przyczyną tego zjawiska jest większe powinowactwo polarnych katechin występujących w herbacie do polarnej powierzchni dwuwarstwy lipidowej, co skutkuje lepszą ochroną przed jej utlenianiem. Przeciwutleniacze hydrofilowe, jakimi są katechiny, są skuteczniejsze w środowisku apolarnym, ponieważ są zlokalizowane na granicy olej-powietrze, chroniąc w ten sposób tłuszcze przed wolnymi rodnikami tlenowymi, podczas gdy przeciwutleniacze hydrofobowe są rozpuszczone w homogenicznej fazie olejowej i przez to mniej aktywne w tym układzie [Yanishlieva-Maslarova 2001].

Skuteczność przeciwutleniacza zależy nie tylko od jego budowy chemicznej, ale także jest w znacznym stopniu zdeterminowana rodzajem środowiska, w którym działa przeciwutleniacz oraz polarnością cząsteczki przeciwutleniacza. Dlatego oznaczenie aktywności przeciwutleniającej składników żywności powinno się odbywać przy zastosowaniu metody, która najlepiej odzwierciedla środowisko (matrycę) danego produktu (układ wielofazowy, środowisko wodne lub środowisko tłuszczowe).

5.1.3. Czynniki wpływające na aktywność przeciwutleniającą herbaty zielonej

Spośród wszystkich rodzajów herbat: czarnej, czerwonej i zielonej, herbata zielona charakteryzuje się najwyższą aktywnością przeciwutleniającą w teście DPPH [Ohmori et al. 2005, Satoh et al. 2005, Yokozawa et al. 1998]. Aktywność przeciwutleniająca herbaty zielonej, wyrażona jako zdolność zmiatania rodników nadtlennokowych (ROO[•]), jest również wyższa niż aktywność bogatych w związki polifenolowe warzyw (jarmużu, szpinaku, kalafiora i czosnku) [Cao et al. 1996].

Istotny wpływ na aktywność przeciwutleniającą herbaty zielonej ma ilość i jakość związków polifenolowych w niej występujących. Proces technologiczny otrzymywania herbaty zielonej umożliwia zachowanie, w niezmiennym składzie, związków polifenolowych obecnych w świeżych liściach herbaty. W związku z powyższym katechiny stanowią średnio 75% frakcji polifenolowej herbaty zielonej i to właśnie duża zawartość katechin w znacznej mierze determinuje jej aktywność [Arts M. et al. 2002, Salah et al. 1995].

Zawartość katechin w herbacie czarnej jest znacznie niższa niż w herbacie zielonej, co jest następstwem utleniania katechin do teaflawin podczas etapu fermentacji w procesie produkcyjnym tej herbaty. Jednocześnie aktywność przeciwutleniająca herbaty czarnej (TEAC = 5,8 mM/g ekstraktu) jest niższa niż aktywność herbaty zielonej (TEAC = 7,8 mM/g ekstraktu) [Arts M. et al. 2002]. Udział katechin w całkowitej aktywności przeciwutleniającej TEAC herbaty zielonej (obliczony przy uwzględnieniu aktywności TEAC katechin oraz ich zawartości w herbacie) jest bardzo wysoki i wynosi od 78% do 93%, natomiast udział katechin w całkowitej aktywności przeciwutleniającej TEAC herbaty czarnej wynosi tylko 34%. [Arts M. et al. 2002, Salah et al. 1995]. W związku z powyższym można stwierdzić, że im wyższa zawartość katechin tym wyższa aktywność przeciwutleniająca herbaty.

Zawartość związków polifenolowych w świeżych liściach herbaty zależy przede wszystkim od warunków agrotechnicznych i klimatycznych uprawy roślin [Graham 1992]. Zawartość związków polifenolowych w ekstraktach i naparach herbat zielonych jest natomiast uwarunkowana czasem i temperaturą parzenia liści oraz rodzajem rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji. Generalnie wraz ze wzrostem czasu i temperatury parzenia rośnie ilość ekstrahowanych do naparu substancji, a więc rośnie aktywność przeciwutleniająca.

Według Langley-Evans [2000], by uzyskać wysoki potencjał przeciwutleniający herbaty w teście FRAP, należy parzyć liście w temperaturze 90°C. Ponadto w ciągu pierwszych 2 minut parzenia liści herbacianych w temperaturze 90°C następuje najszybsza ekstrakcja związków przeciwutleniających do naparu [Langley-Evans 2000]. Badania Rusak i współpracowników [2008] nad aktywnością przeciwutleniającą herbaty zielonej, parzonej w temperaturze 80°C, w czasie 5, 15 i 30 minut, wykazały, że najwyższą aktywność przeciwutleniającą i jednocześnie najwyższą zawartość katechin w herbacie uzyskuje się po 30 min parzenia. Jednakże w ciągu pierwszych 5 min. stopień ekstrakcji składników herbaty jest największy.

Z kolei inne źródła podają, że napar herbaty zielonej zawiera największą ilość katechin w wyniku parzenia liści w temperaturze 77–80°C. Wyższe temperatury oraz wydłużenie czasu parzenia (do 30 min.) powodują zmianę w składzie katechin – część katechin ulega przemianie do odpowiednich epimerów (np. epigalokatechina do galokatechiny) [Gramza et al. 2005a].

Zawartość związków polifenolowych w ekstraktach z herbaty zielonej zależy również od jakości wody użytej do sporządzenia ekstraktu oraz od rodzaju rozpuszczalnika wykorzystanego do ekstrakcji [Danrong et al. 2009, Gramza et al. 2006, Rusak et al. 2008]. Wysoką aktywność przeciwutleniającą wodnych ekstraktów z herbat, wyrażoną jako stopień

zmianiana $\cdot\text{OH}$, uzyskuje się wykorzystując do ekstrakcji wodę destylowaną lub oczyszczoną za pomocą odwrotnej osmozy [Danrong et al. 2009]. Etanolowe ekstrakty z herbaty zielonej charakteryzują się jednak wyższą zawartością polifenoli i katechin i co z tym się wiąże również wyższą aktywnością przeciwutleniającą w porównaniu do wodnych ekstraktów z herbaty [Gramza et al. 2006, Rusak et al. 2008].

Herbatę można pić z różnego rodzaju dodatkami. Niektóre narody Azji Wschodniej piją herbatę z tłuszczem, Brytyjczycy piją herbatę z dodatkiem mleka. Popularna jest również konsumpcja herbaty z sokiem z cytryny. W wyniku różnych dodatków do herbaty jej aktywność może ulec zmianie [Arts M. et al. 2002, Langley-Evans 2000, Majchrzak et al. 2004, Rusak et al. 2008]. Dodanie kwasu askorbinowego w ilościach od 5 mg do 30 mg na 100 ml naparu herbaty zielonej zwiększa jej aktywność przeciwutleniającą TEAC [Majchrzak et al. 2004]. Przy 30 mg witaminy C w naparze wartość TEAC herbaty wzrasta o 50% w stosunku do próbki nie zawierającej witaminy. Przyczyną wzrostu aktywności herbaty zielonej w obecności kwasu askorbinowego może być regeneracja katechin przez kwas askorbinowy, a także obniżenie wartości pH rozpuszczalnika, co skutkuje szybszą migracją katechin do roztworu, jak również wzrostem stabilności związków [Arts M. et al. 2002, Lotito & Fraga 2000, Majchrzak et al. 2004].

Dodatek mleka do naparu herbaty powoduje spadek aktywności przeciwutleniającej [Arts M. et al. 2002, Langley-Evans 2000]. Spowodowane jest to oddziaływaniem katechin występujących w herbacie z białkami mleka polegającym na powstawaniu kompleksów katechiny-białko, co obniża aktywność przeciwutleniającą katechin [Arts M. et al. 2001, 2002]. Szczególnie duże powinowactwo do białek mleka wykazują najbardziej aktywne katechiny herbaty zielonej: galusan epikatechiny i galusan epigalokatechiny.

5.1.4. Aktywność przeciwutleniająca katechin i herbaty zielonej *in vivo*

Katechiny, występujące w herbacie zielonej, jak i ekstrakty z herbaty, są dobrymi przeciwutleniaczami *in vitro*. Jednakże z fizjologicznego punktu widzenia istotne jest, czy konsumpcja herbaty zielonej lub suplementów diety bogatych w katechiny może przyczynić się do zapobiegania tlenowym uszkodzeniom w organizmie. Liczne badania *ex vivo* oraz *in vivo* na zwierzętach i ludziach pozwoliły oznaczyć zarówno stopień hamowania utleniania lipidów, białek czy DNA i/lub całkowitą aktywność przeciwutleniającą osocza krwi czy też moczu [Frei & Higdon 2003, Higdon & Frei 2003, Rietveld & Wiseman

2003]. Do charakterystycznych biomarkerów w badaniach *ex vivo* i/lub *in vivo* należą produkty peroksydacji lipidów takie jak wodoronadtlenki (ROOH), F₂-izoprostan lub aldehyd *dimalonowy* (MDA) oznaczany za pomocą metody z wykorzystaniem kwasu tiobarbiturowego (metoda TBARS) oraz produkt utleniania DNA, jakim jest 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna (8-OHdG). Całkowitą aktywność przeciwutleniającą osocza oznacza się najczęściej metodami ORAC, TEAC lub FRAP.

Wyniki badań klinicznych wykazały, że spożycie herbaty zielonej (jednorazowa dawka 5 g ekstraktu/ 150 ml wody) opóźnia utlenianie LDL [Ohmori et al. 2005]. Faza opóźnienia utleniania LDL, mierzona ilością powstałych skoniugowanych dienów, osiąga maksimum po 2h od spożycia herbaty. Ochronny efekt herbaty zielonej wobec LDL jest wynikiem wzrostu stężenia poszczególnych katechin w osoczu krwi, ponieważ stężenie katechin osiąga maksimum po 2h od podania herbaty, co pokrywa się z max. fazy opóźnienia utleniania LDL.

Konsumpcja herbaty zielonej może również obniżać tlenowe uszkodzenia DNA *in vivo* [Klaunig et al. 1999]. Klaunig i współpracownicy dowiedli, że spożycie dziennie 900 ml herbaty zielonej przez 7 dni u osób palących papierosy obniża o 40% poziom 8-OHdG w moczu i białych krwinkach oraz powoduje spadek o 50% poziomu MDA w moczu w porównaniu do próbki kontrolnej (wody).

Badania Xu i współpracowników [2004] nad aktywnością przeciwutleniającą katechin obecnych w herbacie zielonej wykazały, że potencjał przeciwutleniający osocza krwi szczurów (oznaczony przy użyciu metod: FRAP i DPPH) znacznie wzrósł po podaniu doustnej dawki mieszaniny katechin w ilości 4000 mg/kg masy ciała. Maksimum aktywności przeciwutleniającej zaobserwowano w 40 minucie od podania mieszaniny, co pokrywa się w czasie z maksimum stężenia katechin w osoczu.

Konsumpcja herbaty zielonej powoduje również zależny od dawki wzrost aktywności przeciwutleniającej (w teście TEAC) osocza krwi ludzi [Sung et al. 2000]. Całkowita zdolność przeciwutleniająca, po spożyciu 2 filiżanek herbaty (1 filiżanka = 2,5 g liści/150ml wody), jest o 7% w 60 min. i o 6,2% w 120 min. większa w stosunku do próbki kontrolnej (wody). Zwiększenie dawki do 3 filiżanek herbaty powoduje wzrost aktywności przeciwutleniającej osocza o 12% w 60 min., przy czym aktywność ta nie ulega zmianie, co najmniej do 120 min. od podania herbaty. Z kolei Serafini i współpracownicy [1996] wykazali, że spożycie 300 ml herbaty zielonej zwiększa zdolność przeciwutleniającą TRAP osocza o 40% w 30 min. Jednakże już po 80 minutach od konsumpcji, TRAP osiąga wartość wyjściową.

Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, że wzrost aktywności przeciwutleniającej osocza krwi, po konsumpcji herbaty, jest krótkotrwały i stosunkowo niewielki, co może być spowodowane ograniczoną przyswajalnością katechin oraz ich szybkim metabolizmem do metylowych i/lub glukuronowych pochodnych [Lambert et al. 2007, Xu et al. 2004]. Poza tym, aktywność przeciwutleniająca katechin może być maskowana w wyniku interakcji katechin z białkami krwi [Arts M. et al. 2001]. Chociaż w tej kwestii wyniki badań są rozbieżne [Frei & Higdon 2003].

5.2. Właściwości proutleniające katechin

Zgodnie z zasadą Paracelcusa: *”Wszystko jest trucizną i nic nie jest trucizną. Tylko dawka czyni, że dana substancja jest trucizną”*, związki polifenolowe charakteryzujące się korzystnymi dla organizmu właściwościami przeciwutleniającymi, mogą, przy zastosowaniu wysokich dawek, wykazywać efekt wręcz odwrotny, działać proutleniająco indukując stres oksydacyjny i powodując tlenowe uszkodzenia składników komórkowych. Przykłady proutleniającego działania katechin są opublikowane w najnowszej literaturze [Elbling et al. 2005, Furukawa et al. 2003, Galati et al. 2006, Kanadzu et al. 2006, Sang et al. 2005b, 2007].

Wyniki badań Chen i współpracowników [2002] wykazały, że epigalokatechina w zakresie stężeń 40 μM – 50 μM skutecznie chroni komórki HepG2 przed toksycznym wpływem wysokich dawek ołowiu (II). Przy stężeniu 40 μM związek ten hamuje również, indukowaną ołowiem, peroksydację lipidów w komórkach. Jednakże wzrost stężenia epigalokatechiny do 80 μM wzmacnia toksyczność ołowiu oraz znacznie zwiększa stopień peroksydacji lipidów w porównaniu do próbki kontrolnej. Biorąc pod uwagę fakt, że w badanym zakresie stężeń epigalokatechiny nie stwierdzono jej toksyczności wobec samych komórek HepG2, niekorzystny wpływ wysokich dawek tego związku jest skutkiem jego właściwości proutleniających.

Kanadzu i współpracownicy [2006], na przykładzie galusanu epigalokatechiny, również wykazali, że właściwości proutleniające związku w dużej mierze zależą od jego stężenia. Przy wysokich stężeniach, rzędu 10^{-3} M galusan epigalokatechiny znacznie zwiększa ilość tlenowych uszkodzeń DNA komórek limfocytów, podczas gdy w zakresie niskich stężeń 10^{-8} M – 10^{-5} M związek ten wykazuje efekt ochronny i zmniejsza ilość uszkodzeń nici DNA.

Wyraźna zależność właściwości (przeciw- czy pro-utleniających) związków polifenolowych od ich stężenia może w znacznym stopniu ograniczać stosowanie przeciwutleniaczy w suplementach diety oraz żywności.

5.2.1. Mechanizmy działania proutleniającego

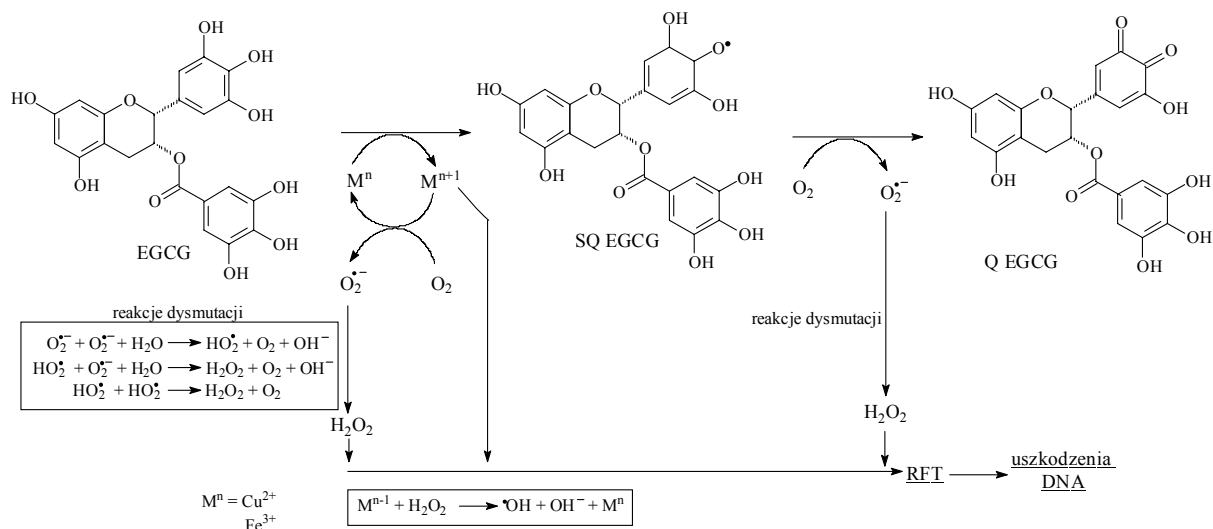
Działaniem proutleniającym związków polifenolowych określa się ich zdolność do generowania wolnych rodników tlenowych i innych reaktywnych form tlenu w wyniku reakcji utleniania i redukcji (cykl redoks) w warunkach tlenowych, które mogą powodować uszkodzenia makrocząsteczek komórkowych (RNA, DNA, białka, lipidy), co prowadzi do zaburzeń ich struktury i funkcji, a w konsekwencji do powstawania i rozwoju wielu stanów chorobowych [Azam et al. 2004, Chen et al. 2002, Furukawa et al. 2003, Halliwell & Gutteridge 2007, Hayakawa et al. 1997, 2004].

Generalnie można wyróżnić dwa mechanizmy działania proutleniającego związków polifenolowych:

- zależny od obecności jonów metali przejściowych,
- niezależny od obecności jonów metali przejściowych.

Zaproponowany przez Furukawa i współpracowników [2003] mechanizm proutleniającego działania katechin w obecności jonów metali przejściowych polega na generowaniu rodników fenoksylowych, chinonów i RFT, takich jak $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 w wyniku bezpośredniej reakcji katechiny z metalem lub reakcji rodnika fenoksylowego katechiny z tlenem (rysunek 4).

W obu reakcjach powstaje, pośrednio (w reakcjach dysmutacji $O_2^{\cdot-}$) duża ilość H_2O_2 , który powoduje tlenowe uszkodzenia zasad: guaniny i tyminy w cząsteczkach DNA. Ponadto H_2O_2 może przenikać przez błony komórkowe i, w obecności jonów metali, stymulować powstawanie najbardziej reaktywnego rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$), który ze względu na brak specyficzności miejsca reakcji z DNA może uszkadzać wszystkie zasady purynowe i pirymidynowe tego kwasu nukleinowego.



Rysunek 4. Mechanizm proutleniającego działania katechin w obecności metali na przykładzie galusanu epigalokatechiny (EGCG). Oznaczenia: SQ EGCG – semichinon galusanu epigalokatechiny, Q EGCG – chinon galusanu epigalokatechiny, RFT – reaktywne formy tlenu [Furukawa et al. 2003]

Niektórzy autorzy twierdzą, że w warunkach fizjologicznych trudno rozważać udział wolnych jonów metali przejściowych w mechanizmie proutleniającego działania związków polifenolowych [Chan et al. 1999, Galati et al. 1999, 2001, 2002]. Jednakże, metale takie jak miedź są obecne w jądrze, związane z chromosomami i zasadami DNA, co może stanowić istotny czynnik dla niekorzystnego działania polifenoli *in vivo*. Związki polifenolowe mogą również ujawniać właściwości proutleniające *in vivo* w przewodzie pokarmowym, gdzie stwierdzono obecność niezaabsorbowanych jonów metali, szczególnie żelaza [Halliwell 2008].

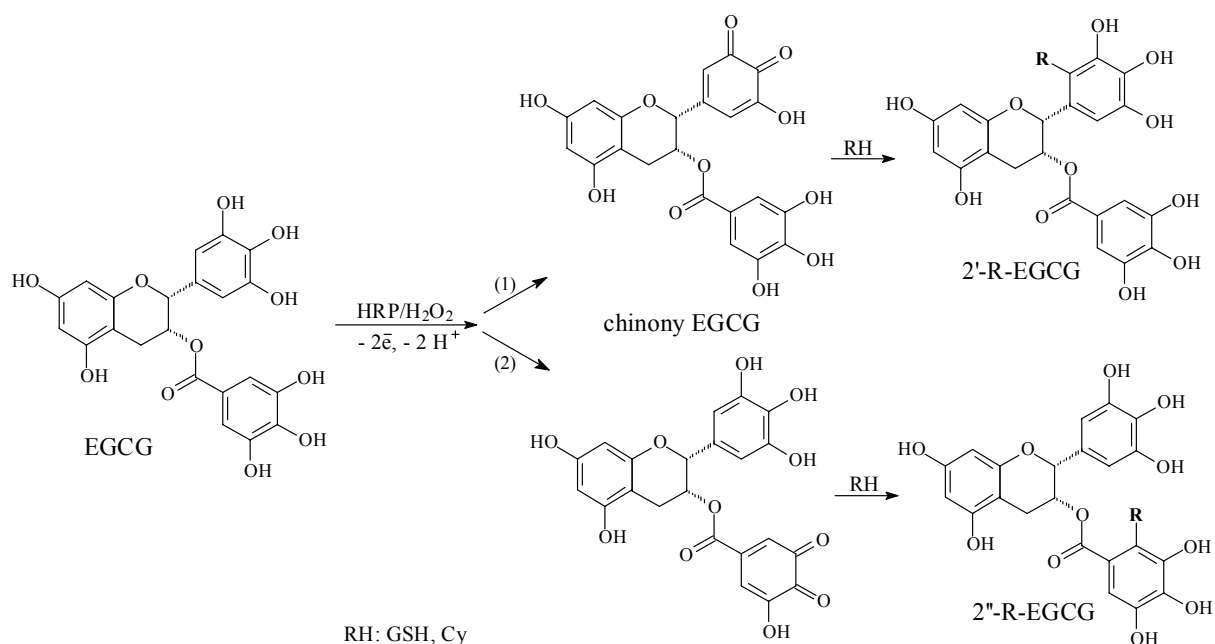
Dowodem na proutleniające właściwości katechin w systemie komórkowym są wyniki badań Furukawa i współpracowników [2003], którzy wykazali, że inkubacja komórek HL-60 (ludzkie komórki białaczki szpikowej) z galusanem epigalokatechiny powoduje znaczny wzrost produktu utleniania DNA – 8-OHdG. Ponadto stopień utleniania DNA, wywołanego przez galusan, rośnie w komórkach HL-60 z obniżonym poziomem wewnątrzkomórkowego przeciwutleniacza – glutationu (GSH). Komórki z niedoborem GSH są bardziej narażone na stres oksydacyjny, dlatego wzrost tlenowych uszkodzeń kwasu nukleinowego w tych komórkach może świadczyć o udziale, w procesie utleniania DNA, wolnych rodników i RFT powstałych w wyniku reakcji utleniania galusanu epigalokatechiny. Obserwowany niekorzystny wpływ galusanu epigalokatechiny na DNA nie ma miejsca w komórkach o zwiększonej odporności na H_2O_2 (komórki HP100), co potwierdza udział H_2O_2

w mechanizmie proutleniającego działania galusanu epigalokatechiny [Furukawa et al. 2003]. Generowanie H_2O_2 przez galusan epigalokatechiny zaobserwowane zostało również w komórkach HL-60 przez Elbling i współpracowników [2005] oraz w innych systemach komórkowych: komórkach białaczki ludzkiej linii Jurkat [Nakagawa et al. 2004] oraz w ludzkich limfocytach [Kanadzu et al. 2006].

Związki polifenolowe mogą również wykazywać działanie proutleniające w obecności enzymów utleniających, takich jak peroksydaza czy tyrozynaza niezależnie od obecności jonów metali przejściowych [Chan et al. 1999, Galati et al. 1999, 2001, 2002]. Rodniki fenoksylowe, które powstają w enzymatycznych, 1-elektronowych reakcjach utleniania mogą ulegać dalszemu utlenianiu do toksycznych chinonów [Awad et al. 2000, 2002a]. Toksyczność form chinonowych wynika z ich wysokiej reaktywności. Ze względu na silnie elektrofilowy charakter, chinony mogą nie tylko wiązać się kowalentnie z makrocząsteczkami komórek, ale również mogą uczestniczyć w reakcjach cyklu redoks generując, w warunkach tlenowych, duże ilości RFT takich jak $O_2^{\cdot-}$ oraz H_2O_2 .

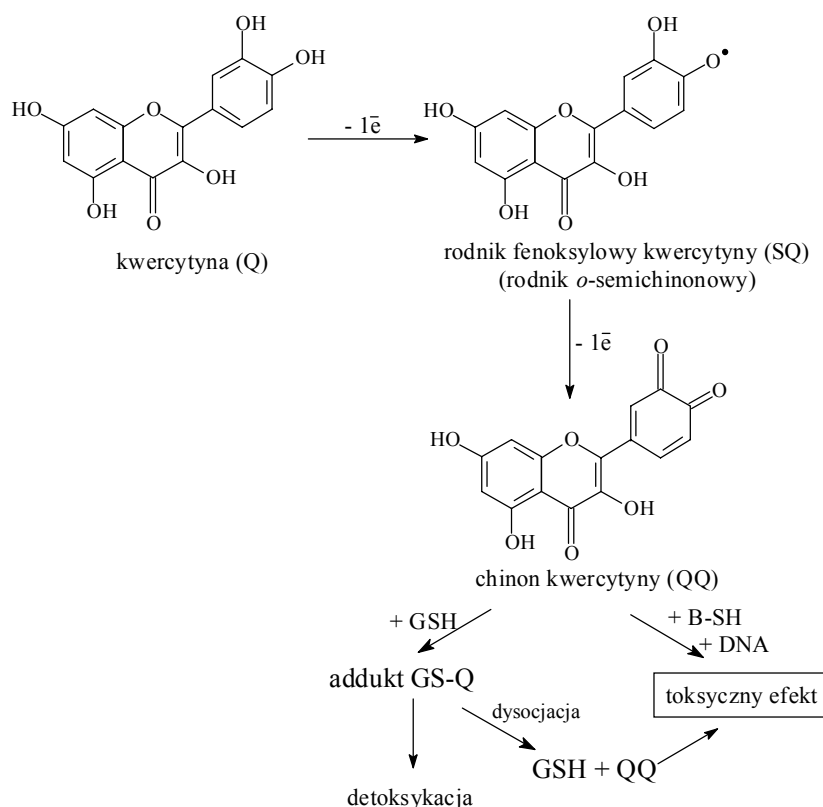
Ze względu na wysoką reaktywność chinonów polifenoli, niemożliwe jest bezpośrednio udowodnić ich powstawanie. Identyfikacji chinonów dokonuje się więc pośrednio poprzez ich reakcję z glutationem (GSH) – niskocząsteczkowym przeciwutleniaczem endogennym – w obecności peroksydazy lub tyrozynazy, katalizujących, odpowiednio, reakcje 1- lub 2-elektronowego utleniania polifenoli. Produktem końcowym tych reakcji są stosunkowo stabilne koniugaty chinonów polifenoli z GSH.

Powstawanie chinonów katechin wykazano poprzez detekcję ich koniugatów z glutationem i/lub cysteiną zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* [Sang et al. 2005b, 2007]. Mechanizm utleniania katechin *in vitro*, na przykładzie galusanu epigalokatechiny, przedstawia rysunek 5. Utlenianie galusanu epigalokatechiny (EGCG) za pośrednictwem peroksydazy (HRP – ang. *Horseradish Peroxidase*) w obecności GSH lub cysteiny (Cy) prowadzi do powstania koniugatów galusanu z glutationem i/lub cysteiną. Chinony galusanu epigalokatechiny mogą również powstawać *in vivo* po podaniu wysokich, toksycznych dawek EGCG (200 mg i 400 mg/kg masy ciała szczura *i.p.*), co udowodniono na podstawie identyfikacji koniugatów galusanu z cysteiną (2'-Cy-EGCG i 2''-Cy-EGCG) [Sang et al. 2005b].



Rysunek 5. Utlenianie galusanu epigalokatechiny (EGCG) w obecności peroksydazy (HRP) oraz glutationu (GSH) lub cysteiny (Cy) w pH 5,5. Produktami pośrednimi reakcji są chinony EGCG, a produktami końcowymi koniugaty EGCG z GSH lub Cy: (1) 2'-R-EGCG oraz (2) 2''-R-EGCG [Sang et al. 2005b, 2007]

Galati i współpracownicy [2006] zaobserwowali, że powstałe chinony galusanu epigalokatechiny mogą działać hepatotoksycznie poprzez stymulowanie produkcji RFT ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) w reakcjach cyklu redoks. Ponieważ hepatocyty z niedoborem GSH są bardziej podatne na cytotoksyczny efekt galusanu epigalokatechiny, autorzy stwierdzili także, że GSH może zmniejszać toksyczność galusanu epigalokatechiny poprzez tworzenie z nim koniugatów [Galati et al. 2006]. Ochronny efekt GSH wobec toksycznego działania form chinonowych związków polifenolowych stwierdzono również w przypadku utleniania kwercetyny [Boots et al. 2005]. Jednocześnie zauważono, że powstałe koniugaty chinonów kwercetyny z GSH mogą dysocjować z utworzeniem związków macierzystych, co prawdopodobnie zwiększa efekt toksycznego działania polifenoli. Glutation może w ten sposób przenosić chinony polifenoli na inne cząsteczki np. białka wchodzące w skład enzymów czy DNA (rysunek 6) [Boersma et al. 2000].



Rysunek 6. Mechanizm proutleniającego działania flawonoidów na przykładzie kwercetyny. Oznaczenia na rysunku: GSH – glutation; B-SH – białka [Boots et al. 2005]

Koniugaty związków polifenolowych z DNA czy białkami zidentyfikowano zarówno w komórkach z podwyższonym poziomem peroksydazy, jak i w komórkach nie posiadających tego enzymu [Walle et al. 2003, van der Woude et al. 2005]. Powyższe wyniki świadczą o tym, że toksyczne chinony mogą powstawać także w wyniku chemicznego utleniania polifenoli, wynikającego z ich działania jako przeciwutleniaczy, co jest istotne ze względu na fakt, że katechiny i ekstrakty z herbaty zielonej wykorzystuje się jako naturalne przeciwutleniacze żywności oraz jako składniki wielu suplementów diety.

Enzymatyczne utlenianie związków polifenolowych w obecności glutationu (GSH) nie zawsze prowadzi do powstania ich koniugatów z GSH. Związki polifenolowe z fenolowym pierścieniem B (naringina, apigenina) mogą utleniać glutation (w systemie peroksydaza/H₂O₂) do disulfidu glutationu (GSSG) [Galati et al. 1999, 2001, 2002]. Reakcja ta zachodzi z pobraniem tlenu, a produktami pośrednimi są wolne rodniki tyłowe glutationu (GS[•] i GSSG^{•-}).

Katechiny jednak, podobnie jak kwercytyna, w obecności peroksydazy/H₂O₂ tworzą koniugaty z GSH, powodując ubytek glutationu, co następuje bez pobrania tlenu

cząsteczkowego i powstawania GSSG [Galati et al. 1999, 2002]. Reakcje koniugacji z GSH w systemie peroksydaza/H₂O₂ są charakterystyczne dla związków posiadających ugrupowanie katecholowe w pierścieniu B. Na podstawie powyższych wyników można wnioskować, że struktura flawonoidów determinuje mechanizm działania proutleniającego.

Jednak nie zawsze mechanizm zależy wyłącznie od struktury związku. Ko i współpracownicy [2006] wykazali, że ekspozycja próbek krwi osób z zespołem niedoboru enzymu G6PD (dehydrogenazy glukozy-6-fosforowej) na epigalokatechinę lub galusan epigalokatechiny powoduje znaczny spadek stężenia GSH przy jednoczesnym wzroście stężenia GSSG. Enzym G6PD jest kluczowy dla powstania NADPH, niezbędnego do regeneracji GSH z jego formy utlenionej (GSSG). Dlatego osoby z niedoborem G6PD są bardziej narażone na stres oksydacyjny niż zdrowi ludzie. Proutleniający efekt w komórkach z niedoborem G6PD obserwuje się tylko dla katechin z grupą pyrogalolową. Mechanizm utleniania GSH przez katechiny jest analogiczny jak dla flawonoidów z fenolowym pierścieniem B. Rozbieżność wyników uzyskanych przez zespoły Galati'ego i współpracowników oraz Ko i współpracowników, co do mechanizmu działania katechin w obecności GSH, może wynikać ze specyfiki systemów, w których zachodzi reakcja.

5.2.2. Czynniki fizyko-chemiczne wpływające na aktywność proutleniającą katechin

Właściwości proutleniające katechin, podobnie jak właściwości przeciwutleniające, zależą od tych samych elementów strukturalnych, m. in. od liczby i rozmieszczenia grup hydroksylowych w cząsteczce. Szczególnie ważna jest obecność w cząsteczce charakterystycznych ugrupowań: katecholowego, pyrogalolowego i reszty kwasu galusowego. Zdania na temat ich wpływu na właściwości proutleniające katechin są podzielone.

Furukawa i współpracownicy [2003] stwierdzili, że zdolność katechin do indukowania tlenowych uszkodzeń DNA w obecności żelaza (III) jest następująca: galusan epigalokatechiny \approx epigalokatechiny > galusan epikatechiny >>> katechiny, podczas gdy w obecności miedzi (II) kolejność jest następująca: galusan epikatechiny > katechiny > galusan epigalokatechiny > epigalokatechiny. Z kolei, na podstawie wyników badań Hayakawa i współpracowników [2004] nad aktywnością proutleniającą katechin w obecności miedzi (II) można stwierdzić, że nie galusan epigalokatechiny, ale epigalokatechiny ma większą zdolność do generowania dużych ilości H₂O₂. Kolejność ta, pokrywająca się również

ze zdolnością tych katechin do indukowania tlenowych uszkodzeń DNA w obecności miedzi (II), jest następująca: epigalokatechina > epikatechina > katechina \approx galusan epigalokatechiny > galusan epikatechiny [Hayakawa et al. 1997]. Mniejsza aktywność proutleniająca galusanu epigalokatechiny niż epigalokatechiny w obecności miedzi (II), jak tłumaczą autorzy, jest wynikiem zdolności reszty kwasu galusowego do chelatowania miedzi, podczas gdy grupa pyrogalolowa pierścienia B galusanu epigalokatechiny jest odpowiedzialna za efekt proutleniający tego związku.

Na istotną rolę grupy pyrogalolowej w działaniu proutleniającym katechin wskazują również badania Ko i współpracowników [2006], według których tylko epigalokatechina i galusan epigalokatechiny są zdolne do utleniania GSH w komórkach z niedoborem enzymu G6PD. Jednakże Galati i współpracownicy [2006] twierdzą, że elementem odpowiedzialnym za wysoką aktywność proutleniającą katechin jest reszta kwasu galusowego, ponieważ tylko galusany katechin oraz kwas galusowy w największym stopniu indukują powstawanie RFT i jednocześnie wykazują wysoką cytotoksyczność wobec hepatocytów.

Z kolei Sang i współpracownicy [2005b], na podstawie zdolności galusanu epigalokatechiny do tworzenia chinonów zarówno w pierścieniu B, jak i reszcie kwasu galusowego, stwierdzili, że oba ugrupowania: pyrogalolowe i reszta kwasu galusowego są odpowiedzialne za właściwości proutleniające katechin.

Na podstawie dostępnych danych literaturowych trudno uszeregować udział poszczególnych ugrupowań strukturalnych katechin w całkowitej aktywności proutleniającej związków. Jednakże większość dotychczasowych badań wskazuje na priorytetowe znaczenie reszty kwasu galusowego i grupy pyrogalolowej w mechanizmie działania proutleniającego katechin. Katechina i epikatechina, posiadające tylko grupę katecholową (3',4'-diOH) w pierścieniu B, charakteryzują się zazwyczaj najmniejszą aktywnością proutleniającą wśród badanych katechin.

Istniejące rozbieżności, co do wpływu poszczególnych elementów struktury na aktywność proutleniającą związków polifenolowych, mogą wynikać z różnych warunków środowiska, w którym przebiega reakcja [Cao et al. 1997]. Istotny wpływ na właściwości proutleniające związków polifenolowych wywiera także obecność i rodzaj jonów metali. Ponadto duże znaczenie dla aktywności proutleniającej katechin może mieć obecność i rodzaj enzymu katalizującego reakcje utleniania (peroksydaza czy tyrozynaza), dostęp tlenu oraz rodzaj medium użytego do badań z wykorzystaniem linii komórkowych. Często badania w systemach komórkowych *in vitro* przeprowadzane są w medium DMEM (ang. *Dulbecco's modified Eagle's medium*), w którym katechiny są niestabilne i łatwo ulegają autooksydacji

z utworzeniem H_2O_2 oraz chinonów/semichinonów, co znacznie zniekształca wyniki badań komórkowych.

Na ocenę aktywności polifenoli *in vivo*, wpływa w dużym stopniu metabolizm związku w organizmie oraz obecność innych przeciwutleniaczy czy ksenobiotyków [Lambert et al. 2007]. Na przykład, Galati i współpracownicy [2006] stwierdzili, że toksyczny efekt galusanu epigalokatechiny i innych katechin może zostać zmniejszony i/lub zniesiony w wyniku enzymatycznego metylowania tych związków. Ochronne działanie reakcji metylowania polega na blokowaniu przez podstawniki metylowe grup hydroksylowych odpowiedzialnych za proutleniające właściwości katechin.

6. Znaczenie właściwości przeciw- i pro-utleniających katechin w profilaktyce chorób cywilizacyjnych

Reaktywne formy tlenu i azotu, generujące stres oksydacyjny lub będące jego konsekwencją, mają swój udział w wielu procesach patologicznych, takich jak indukcja nowotworów, zmiany miażdżycowe, stany zapalne, niektóre schorzenia neurodegeneracyjne [Bartosz 2003].

Liczne badania na zwierzętach oraz na modelach chemicznie indukowanych nowotworów dostarczyły dowodów na przeciwnowotworowe i przeciwmutagenne właściwości herbaty zielonej i występujących w niej katechin [Bunkova et al. 2005, Higdon & Frei 2003].

W pierwszym etapie procesu nowotworzenia pod wpływem różnych czynników genotoksycznych, takich jak RFT/RFA i ksenobiotyki, uszkodzeniu ulega materiał genetyczny. Zmieniony DNA w etapie promocji powoduje mutacje komórek, które niewrażliwe na otaczające mikrośrodowisko ulegają niekontrolowanej replikacji.

Aktywność przeciwutleniająca a choroby cywilizacyjne

Uważa się, że **działanie przeciwmutagenne i przeciwnowotworowe katechin wynika z ich właściwości przeciwutleniających**. Katechiny wraz z innymi przeciwutleniaczami polifenolowymi stanowią pierwszą i drugą linię obrony organizmu przed szkodliwym działaniem RFT. Ze względu na hydrofilowy charakter, katechiny stanowią przeciwutleniającą ochronę płynów ustrojowych i komórki. Efektywnie wygaszają obecne w organizmie $O_2^{\bullet -}$ i 1O_2 [Jovanovic et al. 1995, 1998, Potapovich & Kostyuk 2003].

Szczególnie istotna dla organizmu jest reakcja katechin z $O_2^{\cdot-}$, który, mimo iż wykazuje niską reaktywność wobec struktur komórkowych, może w reakcjach dysmutacji generować najbardziej reaktywną formę tlenu – rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) [Bartosz 2003].

Zdolność katechin do unieczynniania reaktywnych cząsteczek znacznie zmniejsza mutacje materiału genetycznego, co zapobiega rozwojowi nowotworów i chorób degeneracyjnych.

Istotna z medycznego punktu widzenia jest zdolność katechin do inaktywacji reaktywnej formy tlenu w postaci kwasu chlorowego I (HOCl). Reakcje HOCl z zasadami DNA powodują tlenowe uszkodzenia DNA, co z kolei stanowi przyczynę stanów zapalnych w organizmie i może istotnie przyczynić się do rozwoju nowotworu. Kwas chlorowy I wymienia się również jako ważny czynnik inicjujący peroksydację lipoprotein i uczestniczący w rozwoju miażdżycy. Wytwarzany endogennie przez mieloperoksydazę HOCl może również reagować z aminokwasami białek, co skutkuje powstaniem podatnych na hydrolizę, chloroamin. Hydroliza chloroaminowych pochodnych apolipoproteiny B powoduje agregację LDL i rozwój miażdżycy [Duda-Chodak & Tuszyński 2007, Kawai et al. 2008]. Katechiny, dzięki reakcjom bezpośredniego zmiatania HOCl, mogą działać przeciwzapalnie i zmniejszać ryzyko wystąpienia nowotworów oraz miażdżycy [Kawai et al. 2008].

Na podstawie danych literaturowych (przedstawionych w tabeli 7) można stwierdzić, że katechiny wykazują również wysoką zdolność zmiatania nadtlenoazotynu ($ONOO^-$) [Pannala et al. 1997]. Nadtlenoazotyn powstaje *in vivo* w wyniku reakcji tlenu azotu (NO) z anionorodnikiem ponadtlenkowym ($O_2^{\cdot-}$). Ze względu na małą specyficzność utleniania on wszystkie klasy makrocząsteczek: lipidy, białka, aminokwasy lub zasady kwasów nukleinowych [Bartosz 2003]. Zatem inaktywacja $ONOO^-$ przez katechiny może przyczyniać się do zmniejszenia ryzyka wystąpienia nowotworów, jak również zmian aterogennych.

Antymutagenne właściwości katechin polegają także na zmniejszaniu szkodliwych efektów wywołanych przez czynnik mutageny. Badania Anderson i współpracowników [2001] wykazały, że katechiny mogą bezpośrednio reagować z rodnikami nadtlennymi reszt cukrowych DNA i w ten sposób częściowo go naprawiać.

Dzięki zdolności wychwytywania wolnych rodników i innych reaktywnych form tlenu katechiny mogą również hamować aktywację czynników transkrypcyjnych, reagujących na stres oksydacyjny, takich jak czynnik jądrowy kappa B (NF- κ B) czy czynnik AP-1 (ang. *Activator Protein*) [Chung et al. 1999, Higdon & Frei 2003]. Czynnik NF- κ B jest odpowiedzialny przede wszystkim za transkrypcję genów prozapalnych, może również wywoływać efekt antyapoptyczny, co ma kluczowe znaczenie dla rozwoju komórek

nowotworowych [Więclawek et al. 2006]. Inhibicja aktywności czynnika NF- κ B przez katechiny odpowiada więc za efekt przeciwwzapalny i prawidłowe funkcjonowanie organizmu, który w momencie wystąpienia mutacji włącza programowaną śmierć komórki (apoptozę). Czynniki transkrypcyjny AP-1 jest odpowiedzialny zarówno za apoptozę komórek, jak i ich proliferację i różnicowanie. Aktywacja tego czynnika przez szok tlenowy może stymulować promocję i progresję nowotworów piersi, skóry i płuc, gdyż odpowiada on za inwazyjny i metastatyczny charakter komórek nowotworowych. Hamowanie aktywacji czynnika AP-1 przez katechiny może zapobiegać powstawaniu tych nowotworów.

Istnieje również wiele dowodów potwierdzających znaczącą **rolę działania przeciwutleniającego katechin w zapobieganiu zmianom miażdżycowym i zmniejszaniu ryzyka chorób sercowo-naczyniowych.**

Katechiny są zdolne do wychwytywania wolnych rodników i w ten sposób do zapobiegania i/lub przerywania łańcuchowej reakcji utleniania lipidów [Saffari & Sadrzadeh 2004]. Warto podkreślić, że aktywność przeciwutleniająca galusanów katechin, wyrażona jako stopień hamowania peroksydacji lipidów (oznaczony metodą FRAP), jest wyższa od aktywności typowego przeciwutleniacza fazy lipidowej – α -tokoferolu [Hashimoto et al. 2003]. Ponadto hamowanie peroksydacji lipidów przez katechiny zachodzi przy fizjologicznych stężeniach rzędu 0,1 – 1,0 μ M [Intra & Kuo 2007].

Katechiny mogą także w znacznym stopniu zmniejszać proces peroksydacji lipidów poprzez chelatowanie jonów metali przejściowych takich jak miedź i żelazo [Morel et al. 1998]. Zlokalizowane na powierzchni błon komórkowych mogą skutecznie zapobiegać utlenianiu jej składników regenerując ważny przeciwutleniacz fazy lipidowej – α -tokoferol [Sugihara et al. 2001, Salah et al. 1995]. Interakcje katechin z endo- i egzogennymi przeciwutleniaczami mogą również skutkować zjawiskiem synergizmu, co wzmacnia ochronę przeciwutleniającą organizmu [Ziemliński & Wartanowicz 1999].

Obecnie uważa się, że RFT mogą odgrywać ważną rolę w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych [Pan et al. 2003, Weinreb et al. 2004]. W mózgu osób chorych na Parkinsona i Alzheimera obserwuje się zmniejszony poziom glutationu, zwiększone odkładanie się jonów żelaza, wyższą aktywność enzymu indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS – ang. *inducible Nitric Oxide Synthase*) oraz wzmożoną peroksydację lipidów, utlenianie białek i uszkodzenia DNA, co powoduje śmierć komórek substancji czarnej mózgu. Katechiny mogą docierać do tkanek mózgu, gdzie osiągają poziom stężenia porównywalny do tego w wątrobie [Abd et al. 2002] i dzięki właściwościom wychwytywania wolnych

rodników oraz inhibicji enzymu iNOS [Paquay et al. 2000] mogą zmniejszać tlenowe uszkodzenia komórek mózgu [Pan et al. 2003, Weinreb et al. 2004].

Aktywność proutleniająca a choroby cywilizacyjne

Katechiny mogą, zależnie od dawki wchłoniętej do organizmu, wykazywać efekt przeciwutleniający albo wręcz odwrotny, działać proutleniająco. Właściwości proutleniające związków polifenolowych uważa się za niekorzystne dla ludzkiego organizmu, ponieważ powstające w reakcjach utleniania polifenoli silnie elektrofilowe chinony oraz reaktywne formy tlenu mogą uszkadzać makrocząsteczki komórkowe, co stanowi istotny element w powstawaniu i rozwoju wielu schorzeń degeneracyjnych.

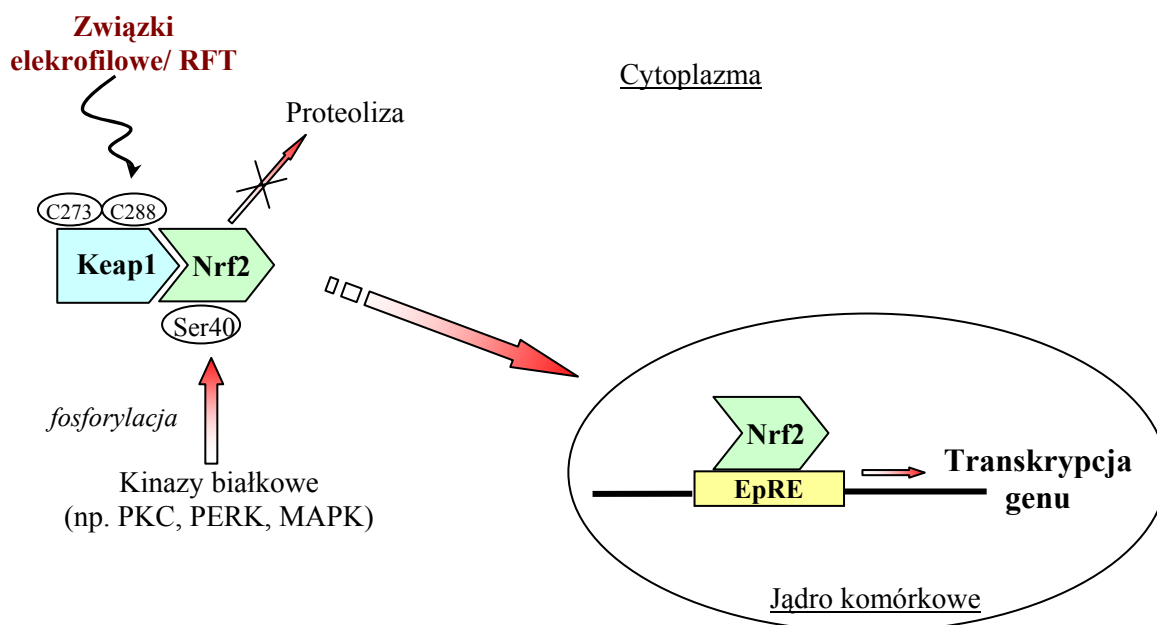
Jednakże badania ostatnich kilkunastu lat dostarczają coraz więcej dowodów na pozytywną rolę właściwości proutleniających związków polifenolowych. Dzięki właściwościom proutleniającym polifenole mogą wpływać na wiele procesów zachodzących w komórce poprzez regulację czynników transkrypcyjnych, szlaków sygnalizujących a także regulację cyklu komórkowego i apoptozy [Chen et al. 2003, Sang et al. 2005a, Yamamoto et al. 2003].

Dotychczasowe badania wykazały, że galusan epigalokatechiny może hamować proliferację komórek nowotworowych i progresję nowotworu na szlaku sygnalizującym kontrolowanym przez receptor epidermalnego czynnika wzrostu (EGFR – ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*). Inaktywacja epidermalnego czynnika wzrostu przez galusan epigalokatechiny zachodzi poprzez generowany, w reakcji utleniania galusanu epigalokatechiny, nadtlenek wodoru (H_2O_2). Istotny udział H_2O_2 w tym mechanizmie potwierdza fakt, że jednoczesna obecność katechiny i dysmutazy ponadtlńkowej (SOD – ang. *Superoxide Dismutase*) lub katalazy (które utleniają H_2O_2) nie hamuje aktywacji EGFR [Sang et al. 2005a].

Katechiny obecne w zielonej herbacie mogą także indukować apoptozę komórek nowotworowych, przy jednoczesnym braku wpływu na zdrowe komórki. Aktywacja apoptozy przez katechiny następuje między innymi za pośrednictwem produktów powstających w reakcjach utleniania katechin, takich jak H_2O_2 i może być skutecznie blokowana przez przeciwutleniacze, takie jak np. glutation i N-acetylo-L-cysteina [Chen et al. 2003, Sang et al. 2005a, Yamamoto et al. 2003].

Katechiny mogą, podobnie jak hydroksyflawony (np. kwercetyna), indukować ekspresję genów kodujących enzymy detoksykacyjne (enzymy II fazy biotransformacji) [Chou et al. 2000, Yang et al. 2006].

Mechanizm ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne, przedstawiony na rysunku 7, jest opisany w najnowszej literaturze [Dinkova-Kostova et al. 2002, Itoh et al. 2004, Kobayashi & Yamamoto 2006]. Z uwagi na to, że część badań przeprowadzonych w toku niniejszej pracy dotyczy indukcji ekspresji genu kodującego oksydoreduktazę NAD(P)H:chinon 1, mechanizmowi temu poświęcono więcej uwagi.



Rysunek 7. Mechanizm ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne za pośrednictwem elementu kontrolującego EpRE. Pozostałe oznaczenia na rysunku: PKC – kinaza białkowa C, PERK – kinaza białkowa retikulum endoplazmatycznego, MAPK – kinazy białkowe aktywowane mitogenami, Ser40 – seryna, C273 i C288 – cysteiny, Keap1 – białko represorowe

Indukcja ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne zachodzi za pośrednictwem tzw. elementu odpowiedzi na związki elektrofilowe – EpRE (ang. *Electrophile-Responsive Element*), który znajduje się w regionie promotorowym genu kodującego dany enzym. Kluczowym regulatorem ekspresji genów jest czynnik transkrypcyjny Nrf2 (ang. *Nuclear erythroid 2-related factor*), który reguluje ekspresję ponad

200 genów kodujących enzymy II fazy biotransformacji, neutralizujących toksyczne metabolity oraz RFT. Do enzymów tych zaliczamy między innymi: oksygenazę hemu, S-transferazę glutationową, katalazę, oksydoreduktazę NAD(P)H chinon 1 [Dinkova-Kostova et al. 2002, 2005a, b, Itoh et al. 2004, Krajka-Kuźniak 2007].

W neutralnych warunkach aktywność Nrf2 jest tłumiona przez białko represorowe Keap1 (ang. *Kelch-like erythroid-cell-derived protein with CNC homology-associated protein 1*) bogate w cysteinę, które tworzy w cytoplazmie kompleks z Nrf2. Decydującym etapem aktywacji ekspresji genów jest uwolnienie Nrf2 z kompleksu, które może nastąpić między innymi na skutek oddziaływań elektrofilowego induktora z białkiem Keap1 (powodując powstanie mostka disiarczkowego w Keap1 (Cy273-Cy288)). Pod wpływem reakcji induktora (cząsteczki elektrofilowe lub RFT) z białkiem represorowym (Keap1), zmianie ulega konformacja Keap1 i Nrf2 zostaje uwolniony z kompleksu, przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z elementem EpRE promotora, co umożliwia transkrypcję genu kodującego dany enzym. Uwolnienie Nrf2 z kompleksu Keap1-Nrf2 może nastąpić również na skutek fosforylacji białka Nrf2 (Ser40) przez specyficzne kinazy (rysunek 7).

Wyniki badań przeprowadzone przez Chen i współpracowników [2000], potwierdziły, że katechiny mogą indukować ekspresję genów posiadających w regionie promotorowym element EpRE zwany dawniej elementem ARE (ang. *Antioxidant-Responsive Element*). Autorzy sugerują, że mechanizm aktywacji transkrypcji tych genów zachodzi za pośrednictwem kinaz [Chen et al. 2000], a nie bezpośrednio pod wpływem związków elektrofilowych.

Regulacja wzrostu, jak i apoptozy komórek nowotworowych oraz indukcja enzymów II fazy biotransformacji przez związki polifenolowe może chronić przed progresją nowotworu [Krajka-Kuźniak 2007]. Dużą rolę w tych procesach odgrywają właściwości protleniające polifenoli, uznawane dotychczas za niekorzystne.

Z punktu widzenia ochronnego działania składników żywności potencjalna zdolność flawonoidów do indukcji ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne zasługuje na szczególną uwagę. Aktywacja tych genów przez składniki obecne w żywności może stanowić skuteczną ochronę komórki przed oddziaływaniem zarówno reaktywnych metabolitów, jak i RFT. Daje to wyraźne podstawy do zastosowania tej indukcji jako strategii zapobiegania nowotworom oraz innym schorzeniom jak choroby neurodegeneracyjne i układu krążenia [Krajka-Kuźniak 2007].

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania nauki wpływem składników żywności na transkrypcję genów. Badaniami nad włączeniem ekspresji genów przez składniki pożywienia zajmuje się transkryptomika żywienia, będąca jedną z dziedzin nutrigenomiki. Celem nutrigenomiki jest stworzenie zindywidualizowanej diety, co stanowi podstawę nowoczesnej prewencji schorzeń [Demińska-Kieć 2007]. Przedmiotem badań nutrigenomiki są również katechiny, ponieważ mogą one modulować drogi przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych oraz aktywować czynniki transkrypcyjne, działając między innymi jako przeciw- i pro-utleniacze.

Szerokie spectrum mechanizmów prozdrowotnych katechin znacznie przyczynia się do zmniejszenia ryzyka chorób cywilizacyjnych, dlatego zaleca się wzbogacanie codziennej diety w te naturalne przeciwutleniacze.

Obecnie na rynku pojawiła się nowa grupa produktów spożywczych zwanych ogólnie żywnością funkcjonalną. Celem żywności funkcjonalnej jest dostarczanie organizmowi składników, które pełnią istotną rolę w utrzymaniu i/lub poprawie zdrowia [Grajek et al. 2005, Yilmaz 2006]. Ważnym składnikiem żywności funkcjonalnej są również katechiny. Właściwości pro-zdrowotne katechin wykorzystuje się w licznych produktach żywnościowych wzbogaconych w ekstrakty z zielonej herbaty, takich jak ciastka, płatki śniadaniowe, błyskawiczny makaron, coca cola oraz chipsy. Ekstrakty z herbaty zielonej dodaje się także do gumy do żucia (patent numer 2001/6,248,346), której żucie może zmniejszać ryzyko infekcji bakteryjnych oraz działać przeciwpłytkowo. Zespół naukowców z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pracuje również nad wykorzystaniem ekstraktów z herbaty zielonej jako dodatku do cukierków żelowych [Gramza-Michałowska & Reguła 2007a]

7. Rola katechin w kształtowaniu i ochronie jakości żywności

W ostatnich latach, w związku z rozwojem międzynarodowego handlu, swobodą przepływu towarów w obrębie UE i krajów stowarzyszonych, wzrostem skali produkcji produktów żywnościowych oraz coraz wyższym stopniem przetworzenia żywności, znaczenia nabiera zagadnienie jakości żywności. Zgodnie z definicją sformułowaną przez Szczuckiego jakość żywności jest to „stopień zdrowotności, atrakcyjności sensorycznej i dyspozycyjności w szerokim konsumenckim i społecznym zakresie znaczeniowym” [Małecka 2006]. Samo pojęcie jakości definiowane jest na wiele sposobów. W warunkach gospodarki

konkurencyjnej większość firm pod pojęciem jakości rozumie wyjście naprzeciw lub przekraczanie preferencji konsumentów [Luning et al. 2005]. Dla realizacji tego założenia firmy produkujące żywność stawiają sobie za cel przede wszystkim zapewnienie bezpieczeństwa zdrowotnego żywności. Zatem nieodłącznym aspektem jakości żywności jest jej bezpieczeństwo, które według „Białej Księgi” z 2000 należy rozpatrywać w szeroko pojętym „kontekście zdrowia publicznego, żywienia, jakości żywności i pasz oraz ekonomicznego bezpieczeństwa konsumenta” [Ozimek 2006].

Współczesny konsument przywiązuje coraz większą wagę do jakości produktów żywnościowych. Zatem na rynku żywności jakość stanowi istotną i wyróżniającą cechę. By produkt żywnościowy był wysokiej jakości dużą uwagę przywiązuje się do jakości w całym łańcuchu żywnościowym, począwszy od producenta, poprzez osoby odpowiedzialne za transport i dystrybucję. Znaczącą rolę w kształtowaniu jakości żywności może także odgrywać konsument, który powinien potrafić dokonać oceny oferowanego na rynku produktu [Ozimek 2006].

Dla zapewnienia bezpieczeństwa żywności na każdym etapie łańcucha jej produkcji istnieją odpowiednie systemy prewencyjne, kontroli i informacji o potencjalnych zagrożeniach, jak również regulacje prawne w obrębie prawa żywnościowego [Wiśniewska 2005]. W celu kontroli i zapewnienia jakości żywności istotne jest poznanie czynników oraz parametrów kształtujących cechy wpływające na percepcję jakości żywności przez klienta. Według Luning’a i współpracowników [2005] wyróżniamy wewnętrzne i zewnętrzne cechy jakościowe żywności. Szczególnie istotne dla właściwości produktu są jego cechy jakościowe wewnętrzne, do których zaliczamy bezpieczeństwo i aspekty zdrowotne produktu, właściwości sensoryczne i trwałość oraz niezawodność produktu (np. odpowiednia masa i skład) oraz wygoda w jego użyciu. By spełniać te cechy oferowany na rynku produkt musi być wolny od zagrożeń chemicznych, mikrobiologicznych czy fizycznych z dopuszczalnym ryzykiem [Luning et al. 2005]. Występowanie jakiegokolwiek z tych czynników może prowadzić do niekorzystnych zmian powodujących obniżenie jego trwałości, pogorszenie walorów sensorycznych czy też zdrowotnych.

Ze względu na kształtowanie jakości żywności istotną rolę w tym zakresie, spośród wszystkich związków polifenolowych, pełnią katechiny. Obok antocyjanów katechiny mają duży wpływ na jakość sensoryczną produktów żywnościowych, takich jak: owoce, warzywa oraz ich przetwory, a także herbata, wino i czekolada. Katechiny biorą udział w procesie enzymatycznego brunatnienia owoców, co na ogół obniża jakość sensoryczną oferowanych przetworów owocowych. Jednakże w przypadku niektórych produktów proces brunatnienia

jest jak najbardziej wskazany i umożliwia uzyskanie właściwych cech organoleptycznych np. podczas suszenia śliwek czy daktyli. Utlenianie katechin, w trakcie produkcji herbat fermentowanych czy półfermentowanych, warunkuje również aromat tych produktów. Dzięki temu procesowi uzyskuje się herbaty o atrakcyjnym smaku i zapachu. Katechiny wpływają także na barwę win. W reakcjach kopigmentacji katechiny tworzą kompleksy z antocyjanami, co wzmacnia intensywność barwy wina. Proces ten zachodzi w początkowej fazie fermentacji przy pH w zakresie 3 – 5 i stosunkowo niskim poziomie alkoholu etylowego. Ponadto katechiny odpowiadają za charakterystyczny cierpki smak herbaty, wina, piwa, ziarna kakaowego oraz tworzenie się osadów w napojach [Wilska-Jeszka 2002].

W wyniku reakcji chemicznych, mikrobiologicznych i biochemicznych składniki żywności ulegają niekorzystnym zmianom powodującym psucie się produktów. Szczególnie niebezpieczne dla produktów żywnościowych są procesy utleniania zachodzące podczas przetwarzania i przechowywania żywności. Utlenianiu mogą ulegać zarówno substancje tłuszczowe, jak i nietłuszczowe. Szczególnie narażone na utlenianie są tłuszcze. Utlenianie tłuszczów prowadzi do powstania wodoronadtlenków i dalej w wyniku ich reakcji wtórnych tworzą się aldehydy, ketony, estry, laktony, alkohole i eter. Wodoronadtlenki mogą również przekształcać się do produktów o zbliżonej długości łańcucha węglowego, takich jak: ketole, epoksydy i dieny. Produkty utleniania tłuszczów znacznie determinują cechy sensoryczne żywności. Na przykład aldehydy wpływają na charakterystyczny zapach zjełczałego tłuszczu. Produkty powstające (pośrednio lub bezpośrednio) w wyniku utleniania tłuszczów, mogą reagować z innymi składnikami żywności, np. z białkami, barwnikami, witaminami, tworząc trwałe połączenia, co nie tylko pogarsza cechy sensoryczne, takie jak tekstura czy kolor produktu, ale także obniża jego wartość żywieniową. Procesy utleniania stanowią także źródło reaktywnych substancji toksycznych, jakimi są wolne rodniki.

By zapobiec niekorzystnym zmianom wywołanym procesami utleniania oraz przedłużyć trwałość produktów w przemyśle spożywczym stosuje się różnego rodzaju zabiegi, takie jak np. pakowanie produktów w próżni czy w atmosferze gazu obojętnego. Jednakże dla wielu produktów jest to niewystarczające, dlatego niezbędny jest dodatek przeciwutleniaczy [Drozdowski 2002, Gordon 2001, Yanishlieva-Maslarova 2001]. Wzbogacanie produktów w naturalne przeciwutleniacze odbywa się metodami bezpośrednimi (technologicznymi) polegającymi na dodatku przeciwutleniacza do produktu podczas jego procesu produkcyjnego albo pośrednimi, polegającymi na manipulacjach żywieniowych zwierząt. Efektywność tej drugiej metody jest jednak w dużym stopniu uzależniona

od wchłaniania, rozmieszczenia i wydalania związków przez organizm zwierzęcy [Franczyk-Żarów et al. 2007].

W przemyśle spożywczym stosowane są zarówno przeciwutleniacze syntetyczne (np. estry kwasu galusowego), jak i naturalne (karotenoidy, tokoferole i związki polifenolowe). Zarówno jedna, jak i druga grupa przeciwutleniaczy posiada zalety i wady (tabela 9).

Tabela 9. Zalety (zaznaczone kolorem zielonym) i wady (zaznaczone kolorem pomarańczowym) przeciwutleniaczy syntetycznych i naturalnych

Przeciwutleniacze syntetyczne	Przeciwutleniacze naturalne
Niskie koszty otrzymania	Wysokie koszty otrzymania
Szerokie zastosowanie	Ograniczone zastosowanie
Średnia lub wysoka aktywność przeciwutleniającą	Szerokie spektrum aktywności przeciwutleniającej
Rosnące obawy, co do bezpieczeństwa	Postrzegane jako nieszkodliwe związki
Słaba rozpuszczalność	Szeroki zakres rozpuszczalności
Zakaz stosowanie niektórych związków	Rosnące zastosowanie
Słabnące zainteresowanie	Rosnące zainteresowanie

Źródło: [Yanishlieva-Maslarova 2001]

W kontekście zdrowia ludzkiego przeciwutleniacze naturalne wydają się bardziej bezpieczne niż syntetyczne i wzbudzają rosnące zainteresowanie zarówno konsumentów, jak i producentów [Yanishlieva-Maslarova 2001]. Istotnym ograniczeniem stosowania przeciwutleniaczy naturalnych jest jednak ich wysoka cena podyktowana dużymi kosztami ekstrakcji tych związków z materiałów roślinnych, jak również ich właściwości sensoryczne: silny smak i zapach. Mimo to prace nad technologicznym wykorzystaniem przeciwutleniaczy pochodzących z naturalnych źródeł nabierają tempa.

Bogatym i stosunkowo niedrogim źródłem naturalnych przeciwutleniaczy są herbaty zielone. Katechiny występujące w herbatach zielonych, ze względu na ich szerokie spektrum aktywności biologicznych, mogą znaleźć zastosowanie w ochronie składników produktów pochodzenia zwierzęcego, jak i roślinnego przed utlenianiem [Cuppet 2001, Gramza & Korczak 2005b, Mitsumoto et al. 2005, Pokorny & Schmidt 2001a, Tang et al. 2002, 2006].

Szczególnie narażone na utlenianie, ze względu na wysoką zawartość tłuszczów, są produkty pochodzenia zwierzęcego. Katechiny mogą skutecznie obniżać stopień tlenowych uszkodzeń lipidów podczas przechowywania mięsa. Tang i współpracownicy [2002]

wykazali, że suplementacja pasz drobiu katechinami zielonej herbaty (metoda pośrednia wzbogacania w przeciwutleniacze) może zmniejszać tlenowe uszkodzenia lipidów w trakcie przechowywania mięsa drobiowego w stanie zamrożenia przez okres 1 roku. Ochronny wpływ katechin wynika z ich zdolności do regeneracji innego przeciwutleniacza – α -tokoferolu. Dodatek katechin w ilości 300 mg/kg mięsa (metoda bezpośrednia) chroni również przed utlenianiem składniki mięsa czerwonego (wołowiny) i wieprzowiny oraz drobiu i ryb. Ochronny efekt katechin obserwowany jest nawet po obróbce kulinarnej mięsa i wynika prawdopodobnie z ich zdolności do zmiatania wolnych rodników [Tang et al. 2006, Yilmaz 2006]. Jednakże dodatek katechin do mięs może mieć ujemne skutki. Katechiny zielonej herbaty w ilościach 200-400 mg/kg mięsa wołowego chronią poddane obróbce kulinarnej mięso przed utlenianiem, ale jednocześnie powodują przebarwienie mięsa, co znacznie obniża jego jakość sensoryczną. [Mitsumoto et al. 2005]. Poza indywidualnymi katechinami także herbata zielona może służyć jako dodatek do żywności przedłużający jej trwałość. Badania Alghazeer i współpracowników [2008] wykazały, że herbata zielona instant (dodana w ilości 250 ppm) zapobiega powstawaniu aldehydów w surowym mięsie makreli podczas przechowywania w temperaturze -10°C przez 16 miesięcy. Katechiny i herbata zielona mogą znaleźć również zastosowanie jako przeciwutleniacze w produktach mlecznych. Dodatek ekstraktu z herbaty zielonej (0,02%) do masła znacznie wydłuża okres indukcji nadtlenuków w porównaniu do masła zwykłego [Gramza-Michałowska et al. 2007b].

Produkty pochodzenia roślinnego są (za wyjątkiem olejów roślinnych) generalnie w mniejszym stopniu stabilizowane dodatkiem przeciwutleniaczy niż te pochodzenia zwierzęcego. Powodem takiego stanu rzeczy jest stosunkowo duża zawartość w nich naturalnych przeciwutleniaczy takich jak tokoferole czy karotenoidy i polifenole. Jednakże, ze względu na wysoki stopień nienasyceń tłuszczów występujących w produktach roślinnych, utlenianie, w początkowej fazie, zachodzi intensywnie, co powoduje szybszą konsumpcję naturalnie występujących w tych produktach przeciwutleniaczy [Pokorny et al. 2001b]. Dodatek przeciwutleniaczy może więc skutecznie hamować niekorzystne procesy zachodzące podczas przechowywania produktów roślinnych.

Badania nad wykorzystaniem katechin wykazały, że katechiny i ekstrakty z zielonej herbaty mogą stabilizować tłuszcze roślinne, takie jak olej kukurydziany czy słonecznikowy oraz margaryny [Pokorny et al. 2001b, Gramza et al. 2006, Gramza-Michałowska et al. 2007b]. Etanolowy ekstrakt z herbaty zielonej dodany do oleju słonecznikowego (w ilości 1000 ppm) wydłuża o 60 % okres indukcji utleniania tłuszczów (test Rancimat). Efekt ochronny zielonej

herbaty w badanym oleju jest zbliżony do efektu α -tokoferolu (dodanego w ilości 200 ppm) [Gramza et al. 2006].

Podsumowując, można stwierdzić, że w ostatnich kilkunastu latach zauważalne jest rosnące zainteresowanie wykorzystaniem naturalnych przeciwutleniaczy w ochronie jakości produktów żywnościowych. Wyniki wielu badań potwierdzają, że dobrym i stosunkowo niedrogim źródłem przeciwutleniaczy mogą być ekstrakty z herbat zielonych. Ich użycie w procesach technologicznych może istotnie przyczynić się do zmniejszenia stopnia utleniania składników żywności, a także chronić jakość sensoryczną i żywieniową żywności, a zatem wydłużyć czas przechowywania produktów na półkach sklepowych (ang. *shelf life*). Dodatkową zaletą katechin czy ekstraktów z herbat zielonych, w porównaniu do innych naturalnych przeciwutleniaczy otrzymywanych np. z rozmarynu, może być ich znikomy wpływ na smak i zapach produktów. Ponadto, ze względu na szerokie spektrum właściwości pro-zdrowotnych katechin (np. przeciwwirusowe czy przeciwnowotworowe), dodatek tych naturalnych przeciwutleniaczy do żywności w celu ochrony jej składników może zwiększać akceptację produktów przez konsumentów, którzy sceptycznie podchodzą do różnego rodzaju dodatków syntetycznych.

CEL PRACY I ZAŁOŻENIA BADAWCZE

Celem pracy było określenie czynników decydujących o aktywności przeciwutleniającej zarówno herbat zielonych, jak i wybranych katechin występujących w tych herbatach oraz sprawdzenie możliwości wykorzystania wartości TEAC (określającej właściwości przeciwutleniające) jako parametru do oceny jakości herbat zielonych różnych marek. Zbadano również zdolność katechin, występujących w herbatach zielonych, do indukcji ekspresji genu kodującego ważny enzym detoksykacyjny – oksydoreduktazę NAD(P)H:chinon 1 oraz określono rolę właściwości protleniających katechin w mechanizmie tej indukcji.

Szczegółowy zakres badań podjętych dla realizacji celu pracy był następujący:

1. Zbadanie wpływu czynników, takich jak zawartość związków polifenolowych ogółem, zawartość katechin oraz pH środowiska na aktywność przeciwutleniającą herbat zielonych, a także sprawdzenie możliwości zastosowania wartości TEAC jako parametru do oceny jakości herbat.
2. Wybór katechin występujących w herbatach zielonych jako związków modelowych.
3. Zbadanie wpływu pH środowiska na aktywność przeciwutleniającą wybranych katechin występujących w herbatach zielonych.
4. Zbadanie wpływu właściwości kwasowo-zasadowych (wartości pKa) wybranych katechin występujących w herbatach zielonych na aktywność przeciwutleniającą TEAC tych związków.
5. Określenie wpływu struktury katechin na ich aktywność przeciwutleniającą przy pomocy parametrów molekularnych określających zdolność cząsteczki przeciwutleniacza do oddawania atomu wodoru bądź elektronu.
6. Zbadanie indukcji ekspresji genu kodującego oksydoreduktazę NAD(P)H: chinon1 (NQO1) oraz wyjaśnienie roli właściwości protleniających katechin w mechanizmie tej indukcji.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

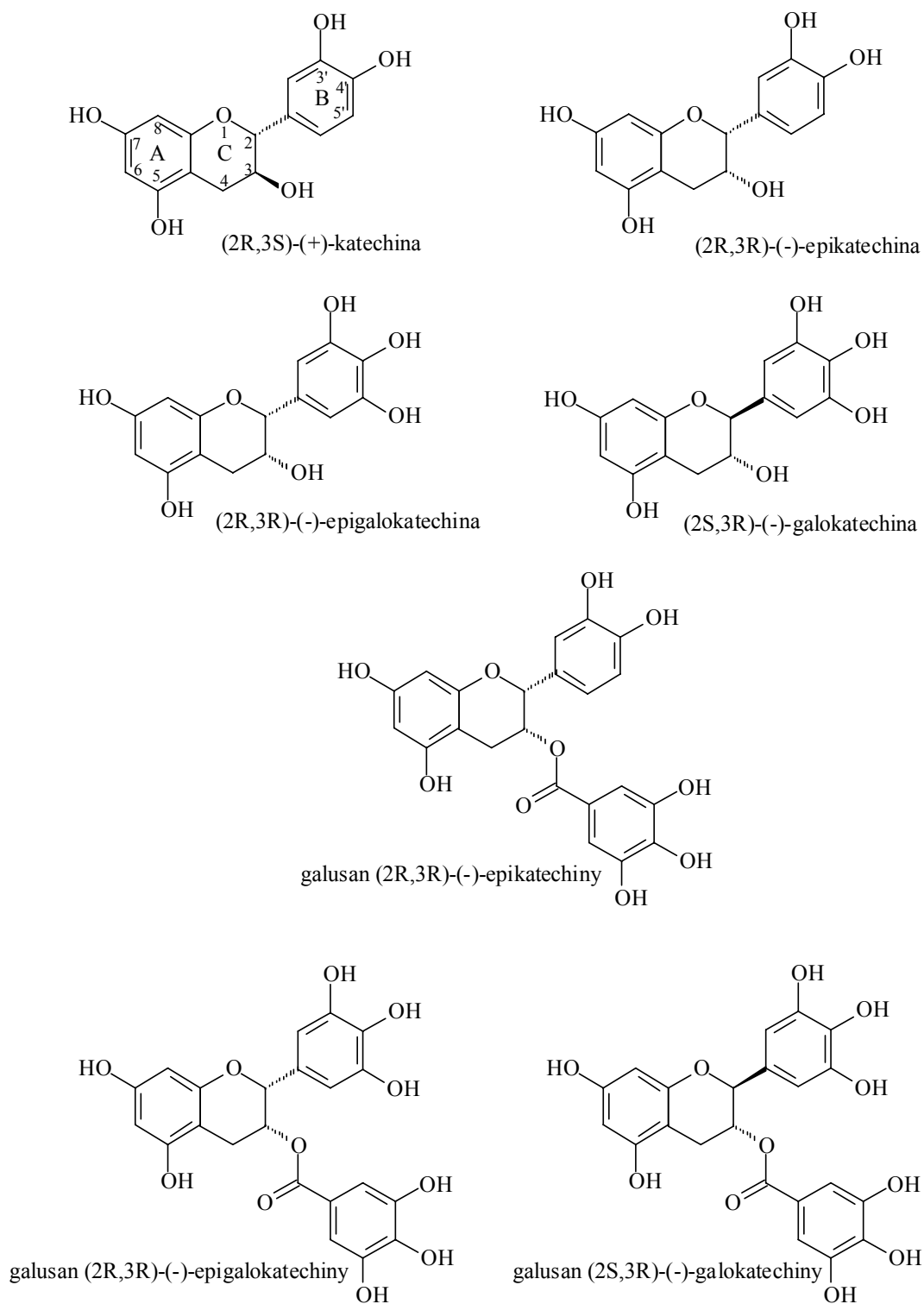
Rozdział III. Materiały i metody

8. Materiały

8.1. Katechiny

- (+)-Katechina uwodniona (2*R*,3*S*), czystość $\geq 96\%$ HPLC
firmy Fluka (Steinheim, Niemcy)
- (-)-Epikatechina z zielonej herbaty (2*R*,3*R*), czystość $\geq 90\%$ HPLC
firmy Sigma (Steinheim, Niemcy)
- (-)-Epigalokatechina z zielonej herbaty (2*R*,3*R*), czystość $\geq 98\%$ HPLC
firmy Sigma (Steinheim, Niemcy)
- (-)-Galokatechina z zielonej herbaty (2*S*,3*R*), czystość $> 98\%$ HPLC
firmy Sigma (Steinheim, Niemcy)
- Galusan (-)-epikatechiny z zielonej herbaty (2*R*,3*R*), czystość $\geq 98\%$ HPLC
firmy Sigma (Steinheim, Niemcy)
- Galusan (-)-epigalokatechiny z zielonej herbaty (2*R*,3*R*), czystość $\geq 95\%$ HPLC
firmy Sigma (Steinheim, Niemcy)
- Galusan (-)-galokatechiny z zielonej herbaty (2*S*,3*R*), czystość $\geq 98\%$ HPLC
firmy Sigma (Steinheim, Niemcy)

Wzory strukturalne badanych katechin przedstawiono na rysunku 8.



Rysunek 8. Wzory strukturalne badanych katechin

8.2. Herbaty zielone

Herbaty zielone liściaste wybrano z dostępnych w handlu produktów i zakupiono w lokalnym sklepie. Kryterium doboru herbat był udział (mierzony wielkością sprzedaży) danej marki w rynku (badania firmy Pentor, 2003). Herbaty zielone wykorzystane do badań:

- Ahmad Tea London Green Tea Special Blend (oznaczona w pracy symbolem A)
masa netto 100g, numer partii: 01/07/2009
Ahmad Tea Limited, Wielka Brytania
- Vitax herbata zielona liściasta (oznaczona w pracy symbolem B)
masa netto 100g, numer partii: 602 489 102
Multeafil Sp. z o.o.
- Yunnan Green Tea (oznaczona w pracy symbolem C)
masa netto 100g, numer partii: 604
Yunnan Tea Garden Group, Shareholding Co.Ltd., Chiny
- Posti Green Tea (oznaczona w pracy symbolem D)
masa netto 100g, numer partii: 11.2009/040 6
PH-W Posti S.A., Polska
- Bio-Active Silver Moon Green Tea (oznaczona w pracy symbolem E)
masa netto 100g, numer partii: S3 02.2010
Bio-Active Dystrybucja Sp. z o.o., Polska
- Bastek Gunpowder Tea (oznaczona w pracy symbolem F)
masa netto 100g, numer partii: D.P.P.24.25/63
Bastek Coffee &Tea sp.j., Polska

8.3. Pozostałe odczynniki

Związki modelowe:

- galusan metylu, firmy Fluka (Steinheim, Niemcy)
- Troloks (kwas 6-hydrokso-2,3,7,8-tetrametylochromano-2-karboksyłowy), firmy Sigma (Steinheim, Niemcy)
- *tert*-butylohydrochinon (tBHQ), firmy Fluka (Steinheim, Niemcy)

Związki wykorzystane w metodzie TEAC:

- ABTS (2,2'-azynobis-3-etylobenzenotiazolino-6-sulfonian diaminowy), firmy Roche (Manheim, Niemcy)
- enzym mikroperoksydaza-8 (MP8), firmy Sigma (Steinheim, Niemcy)
- nadtlenek wodoru 30% (H₂O₂), firmy Merc (Darmstadt, Niemcy)
- substraty do przygotowania roztworów buforowych, firmy Merck (Darmstadt, Niemcy): chlorek sodu (NaCl), chlorek potasu (KCl), kwas octowy (CH₃COOH), octan sodu (CH₃COONa), diwodorofosforan potasu V (KH₂PO₄), wodorofosforan potasu V (K₂HPO₄), kwas solny 35 – 38% (HCl), wodorotlenek sodu (NaOH)

Związki wykorzystane w metodzie DPPH:

- DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylhydrazyl), firmy Sigma (Steinheim, Niemcy)
- metanol, czystość HPLC, firmy Merc (Darmstadt, Niemcy)

Rozpuszczalniki:

- etanol, czystość HPLC, firmy Merck (Darmstadt, Niemcy)
- dimetylosulfotlenek (DMSO), firmy Agros Organics (New Jersey, USA)

Związki wykorzystane w metodzie Folin-Ciocoltea'a:

- odczynnik Folin & Ciocolteu 2N, firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Niemcy)
- węglan sodu (Na₂CO₃), firmy Merc (Darmstadt, Niemcy)

Związki i komórki wykorzystane w metodzie EpRE:

- *N*-acetylo-L-cysteina (NAC), firmy Sigma (Steinheim, Niemcy)
- DL-butionino-[S,R]-sulfoksymina (BSO), firmy Sigma (Steinheim, Niemcy)
- komórki Hepa-1c1c7-h-EpRE-Lux (uprzejmy dar prof. Ivonne Rietjens, Wydział Toksykologii, Uniwersytet Wageningen, Holandia)
- odczynniki do hodowli komórkowych firmy Gibco Invitrogen (Breda, Holandia): medium Alpha-MEM, bufor HBSS (ang. *Hank's Balanced Salt Solution*), cieleca surowica płodowa (FCS – ang. *Fetal Calf Serum*), gentamycyna, genetycyna (G418), trypsyna, 50% buforowana sól fizjologiczna (PBS)
- odczynniki do przygotowania buforu do lizy komórek (bufor LSB – ang. *Low Salt Buffer*): DL- ditiotretitol (DTT), bufor Trizma, firmy Sigma (Steinheim, Niemcy), kwas 1,2-diaminocykloheksanotetraoctowy (CDTA), firmy Fluka (Steinheim, Niemcy)

- odczynniki do przygotowania roztworu lucyferyny, firmy Sigma (Steinheim, Niemcy): trycyna, pięciowodny wodorotlenek węgla magnezu II ($(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), siedmiowodny siarczan magnezu II ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), DL- ditiotreitól (DTT), lucyferyna robaczka świętojańskiego, ATP

8.4. Przygotowanie roztworów do badań

8.4.1. Wodne ekstrakty z herbat zielonych

Wodne ekstrakty z herbat zielonych przygotowano zgodnie z normą PN-ISO 3130 parząc 20 g suchych liści herbaty w 300 ml wody demineralizowanej o temperaturze 90°C przez 6 min. Następnie tak otrzymany napar przefiltrowano dwukrotnie i zliofilizowano. Ekstrakty z herbat przechowywano w ciemnym, suchym pojemniku, w temperaturze pokojowej przez okres 2 – 5 dni.

8.4.2. Roztwory badanych przeciwutleniaczy oraz ekstraktów z herbat zielonych do pomiaru aktywności przeciwutleniającej TEAC

Stężenia roztworów podstawowych wybranych katechin, galusanu metylu i Troloksu oraz ekstraktów z herbat dobrano w taki sposób, by uzyskać liniową zależność różnicy absorbancji (ΔA), obliczonej na podstawie wartości absorbancji kationorodnika $\text{ABTS}^{*\cdot}$ w czasie 0 i 6 minut (A_0 - A_6), od stężeń końcowych analizowanych związków. Taki rodzaj zależności był niezbędny do wyznaczenia współczynnika nachylenia otrzymanej prostej i obliczenia wartości TEAC (troloksowego równoważnika zdolności przeciwutleniającej) poszczególnych próbek. Prostoliniowy charakter tej zależności wskazywał, że obserwowany spadek absorbancji roztworu kationorodnika był spowodowany reakcją pomiędzy kationorodnikiem $\text{ABTS}^{*\cdot}$ z badanym związkiem/ekstraktem a nie innymi reakcjami ubocznymi.

Roztwory podstawowe katechin i galusanu metylu przygotowano przez rozpuszczenie odpowiednich naważek w etanolu (czystość HPLC). W zależności od aktywności przeciwutleniacza, stężenia przygotowanych roztworów podstawowych wynosiły:

- 0,5 mM dla katechiny i epikatechiny oraz galusanu metylu

- 0,2 mM dla epigalokatechiny, galokatechiny oraz galusanu epikatechiny, galusanu epigalokatechiny i galusanu galokatechiny
- 1,5 mM dla Troloksu

Następnie z 0,5 mM roztworów podstawowych badanych katechin i galusanu metylu przygotowano (przez odpowiednie rozcieńczenie etanolem (czystość HPLC)) roztwory robocze o stężeniach: 0 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M.

Dla 0,2 mM roztworów podstawowych badanych katechin przygotowano następujące stężenia robocze: 0 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M.

Dla Troloksu przygotowano następujące stężenia robocze: 0 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,25 mM, 1,5 mM.

Roztwory podstawowe wodnych ekstraktów z herbat zielonych sporządzono przez rozpuszczenie 0,5 mg ekstraktu w 1 ml wody destylowanej. Następnie przygotowano roztwory robocze o stężeniach 0 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 150 μ g/ml, 200 μ g/ml, 250 μ g/ml, przez odpowiednie rozcieńczenie roztworów podstawowych wodą destylowaną.

Stężenia końcowe badanych katechin i galusanu metylu oraz ekstraktów w kuwetach pomiarowych, bezpośrednio przed odczytem absorbancji, stanowiły 100-krotne rozcieńczenie roztworów roboczych. Wszystkie próbki były dobrze rozpuszczalne w odpowiednich rozpuszczalnikach. Badane roztwory katechin, galusanu metylu i ekstraktów przygotowano bezpośrednio przed każdym pomiarem.

8.4.3. Roztwory ekstraktów z herbat zielonych oraz Troloksu do pomiaru aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH

Roztwory podstawowe wodnych ekstraktów z herbat zielonych przygotowano przez rozpuszczenie 0,5 mg ekstraktu w 1 ml wody destylowanej. Do pomiaru aktywności przeciwutleniającej wyrażonej jako stopień zmiatania rodnika DPPH^{*} wykorzystano roztwory robocze ekstraktów o stężeniach: 0 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 300 μ g/ml, 400 μ g/ml, 500 μ g/ml. Roztwory robocze Troloksu (wykorzystanego jako wzorca) o stężeniach: 0 μ M, 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1,0 μ M, 1,5 μ M, 2,0 μ M sporządzono przez odpowiednie rozcieńczenie 2 mM roztworu podstawowego w metanolu (czystość HPLC). Wszystkie roztwory sporządzano bezpośrednio przed każdym pomiarem.

8.4.4th Bufor LSB (ang. *Low Salt Buffer*) do lizy komórek

Bufor do lizy komórek przygotowano przez rozpuszczenie koncentratu Trizma (stężenie końcowe 10 mM) i kwasu diaminocykloheksanotetraoctowego (CDTA) o stężeniu końcowym 2 mM w wodzie destylowanej. Odczyn pH tak przygotowanego buforu doprowadzono za pomocą HCl do wartości 7,8. Następnie przygotowano 1 mM roztwór ditiotreitolu (DTT) w wodzie destylowanej i dodano do wcześniej sporządzonego buforu w takiej ilości, aby otrzymać 200-krotne rozcieńczenie. Tak przygotowany bufor LSB przechowywano w temperaturze -20°C.

8.4.5. Roztwór lucyferyny

Pięciowodny wodorotlenek węgla magnezu (stężenie końcowe 1,07 mM) rozpuszczono razem z trycyną (stężenie końcowe 20 mM) w wodzie destylowanej. Dodatek trycyny zwiększa rozpuszczalność wodorotlenku węgla magnezu. Tak przygotowany roztwór mieszano do momentu gdy stał się klarowny. Następnie dodano siedmiowodny siarczan magnezu (stężenie końcowe 2,67 mM) oraz kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), 2 mM ditiotreitól (DTT), 470 µM lucyferynę i szybko 5 µM ATP. Odczyn pH mieszaniny sprowadzono do wartości 7,8 za pomocą NaOH. Roztwór lucyferyny przechowywano w temperaturze -20°C.

8.5. Aparatura i sprzęt

- spektrofotometr UV-VIS „SPECTRONIC GENESIS 2”, firmy Milton Roy (USA)
- spektrofotometr UV-VIS-NIR „CARY 5E”, firmy Varian (USA)
- luminometr “Labsystem Luminoskan RS”, firmy Thermo Electron (Holandia)
- HPLC firmy Waters (USA)
- pehametr Delta 350, firmy Mettler Toledo (Wielka Brytania)
- waga analityczna, firmy Sartorius-Werke (Niemcy)
- waga elektroniczna, firmy RadWag (Polska)
- worteks, firmy Julabo (Niemcy)
- wirówka MPW-200, firmy Mechanika Precyzyjna (Polska)

9. Metody badań

9.1. Wyznaczanie aktywności przeciwutleniającej metodą TEAC

Aktywność przeciwutleniającą katechin, galusanu metylu i Troloksu oraz wodnych ekstraktów z herbat zielonych wyznaczono za pomocą zmodyfikowanej metody TEAC (ang. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) [Tyrakowska et al. 1999].

Metoda TEAC jest metodą absorpcyjometryczną, polegającą na wyznaczeniu wartości TEAC (troloksowego równoważnika aktywności antyoksydacyjnej) na podstawie pomiaru zdolności przeciwutleniacza do zmiatania kationorodnika ABTS^{•+} w porównaniu z aktywnością antyoksydanta wzorcowego – Troloksu (analog witaminy E rozpuszczalny w wodzie) [Miller et al. 1993]. Modyfikacja oryginalnej metody, polegająca na zastąpieniu enzymu metmioglobiny mikroperoksydazą-8 (MP8), umożliwia pomiar aktywności przeciwutleniającej związków w szerokim zakresie pH (2,0 – 9,5).

Układ generujący kationorodnik ABTS^{•+} składał się z 3 mM roztworu ABTS w PBS (buforowy roztwór soli fizjologicznej o pH = 7,4) oraz 0,2 μM enzymu MP8. Reakcja została zapoczątkowana przez dodanie H₂O₂ (końcowe stężenie 0,1 mM). Tak przygotowaną mieszaninę inkubowano w temperaturze 30°C przez 60 min. Następnie, by otrzymać roztwory o wartościach pH w zakresie 2,0 – 9,5, roztwór podstawowy kationorodnika ABTS^{•+}, sporządzony jak wyżej, zmieszano w stosunku 1:1 z roztworami 0,2 M buforów octanowych lub fosforanowych o różnej wartości pH. W ten sposób otrzymywano roztwór roboczy ABTS^{•+}, którego pH mierzono bezpośrednio przed dodaniem roztworów roboczych badanego antyoksydanta lub ekstraktu. Wartość absorbancji przygotowanego roztworu roboczego ABTS^{•+} nie przekraczała 0,6.

Pomiar aktywności antyoksydacyjnej katechin, galusanu metylu oraz ekstraktów z herbat przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru UV-VIS „Spectronic Genesis 2” przy długości fali 734 nm. W pierwszej kolejności dokonano pomiaru absorbancji roztworu kationorodnika ABTS^{•+} o określonym pH (A₀). Następnie do każdej z 6 kuwet dodano, w ilości 1% (objętościowy), roztwór badanego związku lub ekstraktu o odpowiednim stężeniu roboczym. Po wymieszaniu reagentów i upływie 6 minut odczytano spadek absorbancji roztworu (A₆). W ten sam sposób wykonano pomiary absorbancji w roztworach o różnych wartościach pH, dodając zawsze roztwory o określonych stężeniach roboczych. W sumie jedno oznaczenie (cały zakres pH) składało się z 96 próbek.

Następnie wykreślono zależności różnicy absorbancji ($\Delta A = A_0 - A_6$) mieszaniny reagentów od stężeń końcowych roztworów badanych związków/ekstraktów w danym pH. Prostoliniowy charakter tej zależności wskazywał, że obserwowany spadek absorbancji roztworu kationorodnika był spowodowany reakcją kationorodnika ABTS^{•+} z badanym związkiem/ekstraktem, a nie innymi reakcjami ubocznymi.

Wartość TEAC, odzwierciedlająca aktywność przeciwutleniającą danego przeciwutleniacza w określonym pH, obliczano dzieląc współczynnik nachylenia prostej wykreślonej dla katechiny lub ekstraktu przez współczynnik nachylenia prostej wyznaczony dla Troloksu.

Wartość TEAC określa się jako milimolowe stężenie Troloksu, który wykazuje aktywność przeciwutleniającą równoważną aktywności badanej substancji o stężeniu 1 mM [Miller et al. 1993, Rice-Evans et al. 1996]. Aktywność przeciwutleniająca Troloksu równa się jedności dla każdej wartości pH, ponieważ wartości absorbancji dla tego związku nie ulegają zmianom wraz ze zmieniającym się odczynem pH roztworów [Tyrakowska et al. 1999].

Wyznaczona zależność wartości TEAC każdego związku/ekstraktu od pH jest średnią z co najmniej trzech niezależnych pomiarów. Powtarzalność wyników dla zmodyfikowanej metody TEAC nie przekroczyła 5% wyrażonych jako współczynnik zmienności.

9.2. Wyznaczanie aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH

Metoda DPPH jest metodą absorpcyjometryczną, pozwalającą ocenić zdolność zmiatania rodnika DPPH[•] w określonym czasie [Sánchez-Moreno et al. 1998]. Pomiaru aktywności przeciwutleniającej związku/ekstraktu dokonuje się na podstawie zaniku absorbancji roztworu rodnika DPPH[•] przy długości fali 515 nm w czasie 30 min. Miarą aktywności przeciwutleniającej jest wartość stężenia przeciwutleniacza powodująca 50% spadek aktywności rodnika DPPH[•] (IC₅₀). Zdolność wygaszania rodnika DPPH[•] można również wyrazić w wartościach TEAC_(DPPH) (troloksowego równoważnika aktywności przeciwutleniającej oznaczonej za pomocą metody DPPH). Wartość TEAC_(DPPH) określa aktywność przeciwutleniającą badanego związku/ekstraktu w porównaniu do aktywności przeciwutleniającej wzorca – Troloksu. Wartość TEAC_(DPPH) dla Troloksu jest równa jedności.

Wyznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktów z herbat zielonych metodą DPPH przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru UV-VIS „Spectronic Genesis 2”. W pierwszej kolejności dokonano pomiaru absorbancji 0,1 mM roztworu rodnika DPPH[•] w metanolu (A_0). Następnie do każdej z 6 kuwet, zawierających metanолоwый roztwór DPPH, dodano, w ilości 1% (objętościowy), wodne ekstrakty z herbat o odpowiednich stężeniach roboczych (patrz pkt. 8.4.3.). Po wymieszaniu reagentów i upływie 30 min. dokonano pomiaru absorbancji roztworu rodnika DPPH[•] z badanym ekstraktem (A_{30}). Następnie, zmierzoną w ten sposób absorbancję próby, określającą stopień zmiatania rodnika DPPH[•], wyrażono w %, korygując uprzednio wartości absorbancji w czasie 30 min. o wartości absorbancji w czasie 0 min. Z wykreślonej zależności stopnia zmiatania rodnika DPPH[•] (wyrażonego w %) od stężenia końcowego badanego ekstraktu wyznaczono wartość nachylenia krzywej. Wartość $TEAC_{(DPPH)}$ obliczono dzieląc nachylenie krzywej sporządzonej dla danego ekstraktu przez nachylenie krzywej wykreślonej (analogicznie jak dla ekstraktów) dla Troloksu. Aktywność przeciwutleniającą wobec rodnika DPPH[•] przedstawiono także w wartościach IC_{50} obliczonych z równania prostej zależności stopnia zmiatania rodnika DPPH[•] od stężenia otrzymanej dla danego ekstraktu.

Dla każdego ekstraktu wykonano trzy niezależne pomiary. Powtarzalność wyników dla metody DPPH nie przekroczyła 6% wyrażonych jako współczynnik zmienności.

9.3. Wyznaczanie pKa katechin

Wartości pKa katechin, których brak w dotychczasowej literaturze, wyznaczono za pomocą metody spektrofotometrycznej [Seuerwald et al. 1998]. Do analizy przygotowano następujące roztwory podstawowe przeciwutleniaczy w etanolu (czystość HPLC):

- 1 mM galusan epikatechiny,
- 2 mM galusan metylu, galusan epigalokatechiny i galusan galokatechiny,
- 4 mM epigalokatechiny i galokatechiny.

Widma badanych przeciwutleniaczy rejestrowano w zakresie długości fali 210 nm do 650 nm w roztworach o wartościach pH z zakresu 2,0 – 9,5. Bufory octanowe lub fosforanowe o stężeniu 0,1 M przygotowano co 0,25 jednostki pH. Wartość absorbancji odczytywano przy długości fali 277 nm i 323 nm (maksima absorbancji dla katechin) oraz 270 nm i 320 nm (maksima absorbancji dla galusanu metylu). Wartości pKa wyznaczono metodą graficzną, dla każdego związku dokonano przynajmniej trzech pomiarów.

9.4. Oznaczanie całkowitej zawartości polifenoli metodą Folin-Ciocalteu'a

Całkowitą zawartość polifenoli w wodnych ekstraktach z herbat zielonych oznaczono za pomocą metody Singleton i Rossi [1965]. Metoda ta jest metodą kalorymetryczną, opartą na pomiarze zmiany barwy odczynnika Folin-Ciocalteu'a przy długości fali 765 nm. Żółty odczynnik Folin-Ciocalteu'a, pod wpływem reakcji z grupami hydroksylowymi związków polifenolowych, ulega redukcji, zmieniając barwę na niebieską.

Oznaczenia zawartości polifenoli ogółem w wodnych ekstraktach z herbat wykonano następująco: 20 μ l próby (0,25 mg/ml) wymieszano z 100 μ l odczynnika Folin-Ciocalteu'a. Po upływie 3 min. do próbki dodano 300 μ l 20% Na_2CO_3 i dopełniono do 2 ml wodą destylowaną. Po dokładnym wymieszaniu próbkę odstawiono w ciemne miejsce na 2 godz. Absorbancję próbki zmierzono przy długości fali 765 nm. Zawartość związków polifenolowych ogółem w badanym ekstrakcie obliczono na podstawie krzywej wzorcowej wyznaczonej dla kwasu galusowego ($y = 0,1319 x$) uwzględniając rozcieńczenia prób i wyrażono w mg kwasu galusowego (mg/g ekstraktu).

9.5. Oznaczanie zawartości katechin metodą HPLC

Rozdziału i identyfikacji katechin obecnych w ekstraktach z herbat zielonych dokonano w oparciu o metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) opracowaną przez dr inż. Annę Gliszczyńską-Świgło. W badaniach wykorzystano chromatograf cieczowy, typ 600, firmy Waters (Milford, MA, USA), wyposażony w detektor UV-Vis typu photodiode-array 996. Do rozdziału badanych związków zastosowano kolumnę analityczną Symmetry C_{18} (3,9 x 150 mm, 5 μ m) firmy Waters. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu (A) i 0,1% kwasu trifluorooctowego (B). Przepływ rozpuszczalników miał charakter gradientowy: gradient liniowy od 1% do 5% A w ciągu pierwszych 17 minut, gradient liniowy od 5% do 35% A w ciągu kolejnej minuty, gradient liniowy od 35% do 50% A w ciągu następnych 11 minut, gradient liniowy od 50% do 100% A w ciągu kolejnej minuty, powrót do warunków początkowych (acetonitryl-kwas 1:99, v/v) w ciągu następnych 10 minut; prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 ml/min.

Detekcji poszczególnych katechin dokonano przy długości fali 280 nm. Objętość nastrzykiwanej próbki wynosiła 20 μ l. Identyfikacja związków odbywała się przez

porównanie ich czasów retencji z czasami retencji wzorców zastosowanych jako wzorce zewnętrzne i wewnętrzne. Dodatkowo obecność katechin w ekstraktach z herbat potwierdzono na podstawie widma absorpcji uzyskanego za pomocą detektora typu photodiode-array.

Zawartość poszczególnych związków w ekstraktach z herbat wyznaczono metodą wzorca zewnętrznego poprzez pomiar pola powierzchni pików poszczególnych katechin na chromatogramie. Krzywe wzorcowe katechin przygotowano co najmniej dwa razy dla każdego związku w tych samych warunkach chromatograficznych, jakie były stosowane do rozdziału katechin w badanych ekstraktach. Dla każdego ekstraktu przeprowadzono co najmniej trzy niezależne oznaczenia.

9.6. Pomiar poziomu indukcji ekspresji genu kodującego oksydoreduktazę NAD(P)H:chinon 1 (NQO1) metodą EpRE-LUX

Pomiar poziomu ekspresji genu kodującego NQO1 przeprowadzono metodą EpRE-LUX badając wpływ katechin na aktywację czynnika transkrypcyjnego Nrf2 aktywującego geny zawierające w regionie promotorowym element EpRE (ang. *Electrophile-Responsive Element*). Wykorzystano do tego celu specjalnie przygotowane linie komórkowe Hepa-1c1c7-h-EpRE-Lux (dar prof. I. Rietjens z Uniwersytetu Wageningen) zwane dalej komórkami EpRE-Lux. Są to komórki wątrobowe myszy (Hepa-1c1c7), do których wprowadzono gen reporterowy (kodujący lucyferazę), zawierający w rejonie promotorowym element odpowiedzi na związki elektrofilowe (EpRE) ludzkiego genu oksydoreduktazy NAD(P)H:chinon 1 (NQO1) [Boerboom et al. 2006].

Uwolniony w wyniku reakcji z katechiną (z chinonem katechiny) czynnik transkrypcyjny Nrf2, po związaniu z EpRE, indukuje ekspresję genu reporterowego kodującego lucyferazę. Zsyntetyzowana lucyferaza katalizuje reakcję utleniania lucyferyny robaczka świętojańskiego, dodanej do zlizowanych komórek, czemu towarzyszy luminescencja, którą mierzono przy użyciu luminometru. Poziom luminescencji odzwierciedla poziom indukcji ekspresji genu kodującego NQO1.

Poziom ekspresji genu kodującego NQO1 wyraża się jako wartość współczynnika indukcji. Współczynnik indukcji jest to zdolność związku do indukowania ekspresji genu lucyferazy w odniesieniu do próbki kontrolnej (czyste medium zawierające 0,5 % DMSO) [Boerboom et al. 2006].

Komórki EpRE-Lux hodowano w medium alpha-MEM wzbogaconym w 10% cielecą surowicę płodową (FCS) oraz antybiotyki gentamycynę (stężenie końcowe 50 µg/ml) i G418 (stężenie końcowe 0,5 mg/ml z 200-krotnie stężonego roztworu) w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37°C. Gdy stężenie komórek EpRE-Lux osiągnęło wartość 3x10⁵ komórek/ml, komórki te przeniesiono na 96-celkową płytkę (100 µl zawiesiny komórkowej/celkę) i poddano 24 godz. inkubacji pozwalającej na przyłączenie się komórek do dna płytki. Następnie medium znad komórek usunięto, a komórki przemyto buforem HBSS i eksponowano na różne stężenia katechin. Zakres stężeń końcowych katechin na płytce wynosił 0 µM – 500 µM. W tym celu do każdej celki płytki dodano 100 µl czystego medium zawierającego badaną katechinę dodaną z 200-krotnie bardziej stężonego roztworu roboczego w DMSO. W ten sposób stężenie DMSO utrzymywało się na poziomie około 0,5%. Po kolejnych 24 godz. inkubacji, komórki EpRE-Lux przemyto 50% buforem PBS, pH 7,4 (100 µl/celkę) i poddano lizie dodając do każdej celki 30 µl buforu LSB (patrz pkt. 8.4.4.). Płytkę z tak przygotowanymi komórkami włożono na 15 min. do lodu, by pozwolić komórkom napęcznić, a następnie na co najmniej 30 min. do temperatury -80°C by zlizować komórki.

Pomiaru poziomu indukcji ekspresji genu kodującego lucyferazę dokonano przy użyciu luminometru „Labsystem Luminoscan RS”. W tym celu do każdej ścianki celki ze zlizowanymi komórkami dodano 100 µl roztworu lucyferyny (patrz pkt. 8.4.5.) i mierzono luminescencję związku przez 2 s. Po tym czasie aktywność enzymu została wygaszona przez dodanie 50 µl 0,2 M roztworu NaOH. Sygnał każdej próbki korygowano o wielkość sygnału tła płytki. Współczynnik indukcji obliczano dzieląc sygnał próbki związku o danym stężeniu przez sygnał próbki kontrolnej (0,5% DMSO). Dla każdego związku dokonano co najmniej trzech niezależnych pomiarów.

9.7. Pomiar poziomu indukcji ekspresji genu kodującego oksydoreduktazę NAD(P)H:chinon 1 (NQO1) w komórkach ze zmodyfikowanym poziomem glutationu

W celu wykazania, że indukcja ekspresji genu kodującego NQO1, za pośrednictwem elementu EpRE, wynika z działania proutleniającego katechin (zdolność do tworzenia chinonów) badania indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 przez różne katechiny przeprowadzono przy użyciu komórek EpRE-Lux zawierających normalny, podwyższony

i obniżony poziom wewnątrzkomórkowego glutationu. Poziom glutationu modyfikowano za pomocą *N*-acetylo-L-cysteiny (NAC) lub DL-butionino-[S,R]-sulfoksyminy (BSO) [Lee-Hilz et al. 2006]. NAC jest prekursorem glutationu, zdolnym do generowania jego dużych ilości w komórkach. BSO jest inhibitorem kluczowego enzymu biosyntezy glutationu – syntetazy (γ -glutamylcysteinowej).

Hodowlę komórek EpRE-Lux przeprowadzono jak w pkt. 9.6. Następnie komórki (3×10^5 komórek/ml) przeniesiono na 96-celkową płytkę. Po 24 godz. inkubacji w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37°C medium znad komórek usunięto, a komórki poddano wstępnej ekspozycji na 40 mM NAC lub 100 μ M BSO we wzbogaconym medium alpha-MEM (medium: patrz pkt. 9.6.). Po 4 godz. inkubacji z NAC lub 24 godz. inkubacji z BSO, pozwalającej, odpowiednio, na wzrost lub obniżenie ilości komórkowego glutationu, medium znad komórek usunięto. W dalszej kolejności komórki ekspozycjonowano na badaną katechinę (100 μ M galusan epigalokatechiny, 100 μ M galusan galokatechiny, 175 μ M epigalokatechinę lub 175 μ M galokatechinę). W tym celu do każdej celki płytki dodano 100 μ l czystego medium alpha-MEM zawierającego 40 mM NAC lub 100 μ M BSO i badaną katechinę. Stężenie końcowe katechiny było tak dobrane by wartość współczynnika indukcji przy danym stężeniu była bliska maksymalnej. Stężenie DMSO, w którym rozpuszczano katechiny do ekspozycji, nie przekraczało 0,5 %.

Po 24 godz. inkubacji komórki zlizowano i dokonano pomiaru poziomu indukcji ekspresji genu kodującego lucyferazę za pomocą luminometru oraz obliczono współczynniki indukcji (patrz pkt. 9.6.).

9.8. Detekcja chinonów katechin

Wysoka reaktywność chinonów katechin uniemożliwia ich bezpośrednią identyfikację. Dlatego chinony katechin zostały wykryte drogą pośrednią poprzez identyfikację koniugatów, które chinony katechin tworzą z glutationem.

Do roztworu glutationu (stężenie końcowe 1 mM), w buforze fosforanowym, pH 7,0, dodano tyrozynazę (stężenie końcowe 100 j.m./ml), a następnie 100 μ M epigalokatechinę lub galusan epigalokatechiny z 10 mM roztworu podstawowego danego związku w DMSO. Następnie, by uzyskać duże stężenie koniugatów, do mieszaniny inkubacyjnej dodawano w czasie trwania inkubacji: glutation i/lub tyrozynazę oraz badany związek według schematu zamieszczonego poniżej.

czas inkubacji [min]	glutation [1 mM]	tyrozynaza [100 U/ml]	katechyna [100 μ M]
0	+	+	+
5	-	-	+
10	-	+	+
15	+	-	+
20	-	+	+
25	+	-	+
30	koniec inkubacji		

Inkubację przeprowadzono w temperaturze 25°C w łaźni wodnej. Otrzymane stężenia koniugatów chinonów katechin z glutationem były wystarczające do ich identyfikacji metodą HPLC.

9.9. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania komputerowego Statistica 6,1. Dla poszczególnych parametrów obliczono podstawowe statystyki opisowe. W celu określenia miary względnego błędu metody TEAC i DPPH obliczono współczynnik zmienności V. W celu zweryfikowania istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi wykorzystano test t-Studenta. Dla zbadania zależności pomiędzy parametrami wyznaczonymi doświadczalnie (wartości TEAC, pKa) a parametrami teoretycznymi (energia deprotonacji wiązania – DE, potencjał jonizacji – IP) dla katechin, jak również zależności pomiędzy wartościami TEAC lub TEAC_(DPPH) a zawartością związków polifenolowych ogółem lub zawartością poszczególnych katechin w ekstraktach herbat zielonych, obliczono współczynnik korelacji r Pearsona. W szacowaniu statystycznym za poziom istotności przyjęto $p < 0,05$.

Rozdział IV. Wyniki badań i dyskusja

10. Czynniki wpływające na aktywność przeciwutleniającą wybranych herbat zielonych

10.1. Wpływ zawartości związków polifenolowych na aktywność przeciwutleniającą wodnych ekstraktów z herbat zielonych

Wzrost zagrożenia chorobami cywilizacyjnymi przy jednocześnie rosnących kosztach opieki zdrowotnej oraz wzrost świadomości konsumentów, co do wpływu diety na ludzkie zdrowie spowodowały gwałtowny wzrost zainteresowania żywnością o udowodnionych właściwościach pro-zdrowotnych tzw. żywnością funkcjonalną. Niewątpliwie do tej grupy żywności można zaliczyć, bogate w związki polifenolowe, owoce i warzywa, herbatę, czekoladę oraz wino. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie pro-zdrowotnymi właściwościami herbaty zielonej. Wzrost zainteresowania właściwościami herbaty zielonej można także rozpatrywać w kontekście potencjalnego wykorzystania ekstraktów z herbaty jako źródeł naturalnych przeciwutleniaczy stosowanych do ochrony składników żywności przed utlenianiem.

Ponieważ polifenole charakteryzują się wysoką aktywnością przeciwutleniającą, której w głównej mierze przypisuje się ich korzystny wpływ na organizm człowieka, jakość i ilość związków polifenolowych, obecnych w produktach roślinnych, takich jak herbata, może stanowić wykładnik jakości tych produktów. Ponadto zawartość polifenoli może być wyróżnikiem decydującym o doborze ekstraktu jako naturalnego przeciwutleniacza do żywności. Z danych literaturowych wiadomo, że ilość związków polifenolowych występujących w herbacie zależy od warunków klimatycznych oraz gatunku i wieku rośliny [Graham 1992, Hara 2001]. Zatem można sądzić, że ekstrakty z herbat będą znacznie różniły się zawartością związków polifenolowych, w tym katechin. Istnieje wiele metod oceny zawartości polifenoli w produktach. Większość z nich jest jednak czasochłonna i pociąga za sobą duże koszty (np. metoda HPLC). Dlatego aktywność przeciwutleniająca, która byłaby dodatnio skorelowana z zawartością związków polifenolowych, mogłaby stanowić szybki i stosunkowo tani test do oceny jakości ekstraktów z herbat zielonych różnych marek.

Pierwszym etapem badań było oznaczenie zawartości związków polifenolowych, w tym poszczególnych katechin, w ekstraktach z herbat zielonych różnych marek.

Całkowitą zawartość związków polifenolowych w badanych ekstraktach wyznaczono metodą Folin-Ciocalteu'a. Zawartość poszczególnych katechin w ekstraktach oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Wyniki badań zamieszczono w tabeli 10 oraz zilustrowano na rysunkach 9 i 10.

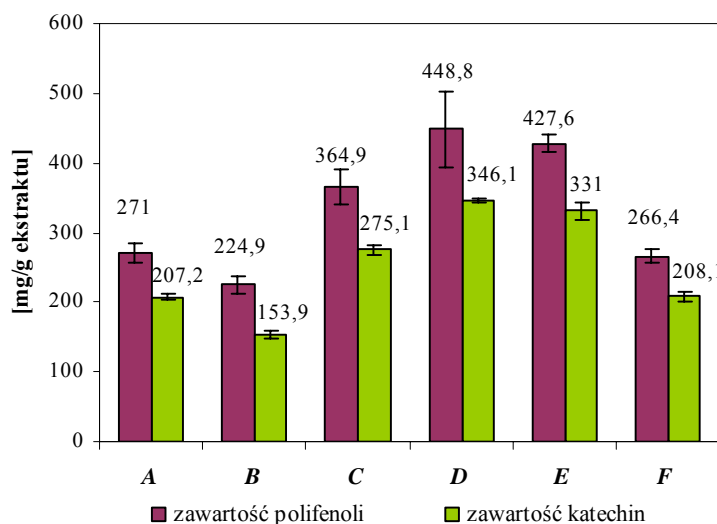
Tabela 10. Zawartość poszczególnych katechin, katechin ogółem (TCC) oraz całkowita zawartość polifenoli (TPC) w wodnych ekstraktach z herbat zielonych (*A, B, C, D, E* i *F*). Badane katechiny oznaczono następującymi skrótami (z ang.): katechina (C), epikatechina (EC), epigalokatechina (EGC), galokatechina (GC), galusan galokatechiny (GCG), galusan epikatechiny (ECG) i galusan epigalokatechiny (EGCG).

ekstrakt	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>
[mg/g ekstraktu]						
C	-	-	-	24,2 ± 0,6	5,9 ± 0,3	6,4 ± 0,4
EC	15,8 ± 0,3	15,9 ± 0,3	38,5 ± 1,3	44,5 ± 0,6	35,4 ± 1,3	19,4 ± 0,6
GC	4,4 ± 0,0	5,9 ± 0,0	9,2 ± 0,5	18,7 ± 0,4	8,6 ± 0,2	10,1 ± 0,5
EGC	62,4 ± 1,7	50,4 ± 1,7	57,6 ± 1,8	78,8 ± 1,4	122,2 ± 4,5	70,6 ± 2,6
GCG	2,7 ± 0,1	2,4 ± 0,1	7,6 ± 0,3	6,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1
ECG	19,9 ± 0,4	17,2 ± 0,2	63,1 ± 1,9	63,1 ± 0,8	29,2 ± 1,0	20,7 ± 0,8
EGCG	101,9 ± 1,8	62,1 ± 1,9	99,1 ± 2,0	110,5 ± 1,7	128,5 ± 6,2	78,8 ± 2,6
TCC	207,2 ± 3,5	153,9 ± 4,6	275,1 ± 6,2	346,1 ± 2,9	331,0 ± 13,4	208,1 ± 6,6
TPC	271,0 ± 14,0	224,9 ± 12,1	364,9 ± 24,7	448,8 ± 54	427,6 ± 12	266,4 ± 8,6

Na podstawie analizy wyników zawartych w powyższej tabeli i przedstawionych na rysunku 9 można stwierdzić, że całkowita zawartość polifenoli (TPC – ang. *Total Polyphenol Content*) oraz zawartość katechin (TCC – ang. *Total Catechin Content*) różni się w zależności od marki herbaty. Ogólna ilość katechin jest silnie skorelowana z zawartością polifenoli. Współczynnik korelacji dla tej zależności wynosi $R = 0,973$ ($p < 0,05$). Najwyższą zawartością polifenoli, w tym katechin, charakteryzują się ekstrakty z herbat C, D i E. Zawartość polifenoli w tych ekstraktach jest większa średnio o 55% w stosunku do herbat A

i F oraz o 85% w stosunku do herbaty B. Zaobserwowane różnice w zawartości katechin i polifenoli w herbatach różnych marek mogą wynikać z różnic gatunkowych i wieku rośliny oraz warunków jej uprawy. Znaczące różnice w zawartości katechin występujących w herbatach różnych marek stwierdzili również Henning i współpracownicy [2003].

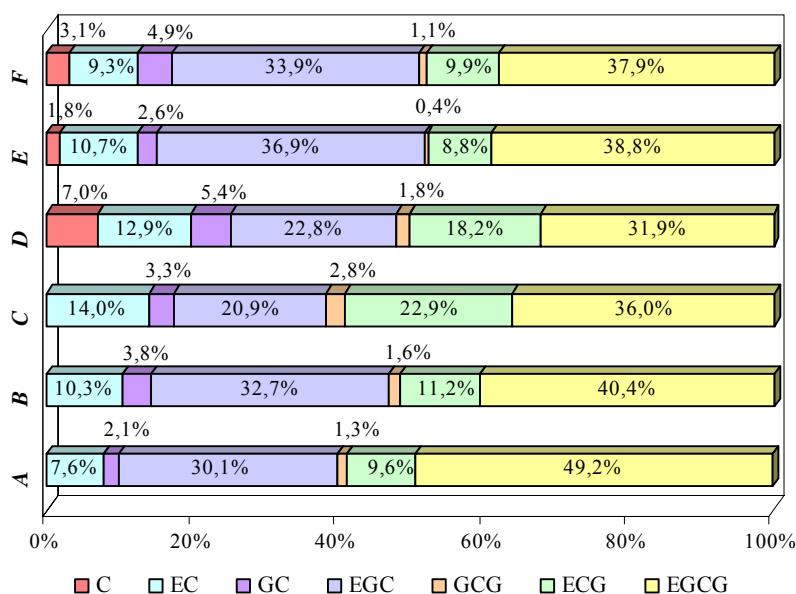
Średnia całkowita zawartość polifenoli badanych ekstraktów jest zgodna z wartościami literaturowymi opublikowanymi przez Gramzę i współpracowników [2006] oraz Satoh i współpracowników [2005]. Wyniki badań tych autorów wskazują, że wodne ekstrakty z herbat zielonych zawierają, odpowiednio, 302,3 mg i 312,5 mg związków polifenolowych w 1 g ekstraktu.



Rysunek 9. Całkowita zawartość związków polifenolowych oraz zawartość katechin w wodnych ekstraktach z herbat zielonych (n=3). Wykres sporządzony na podstawie wyników zawartych w tabeli 10.

W badanych przeze mnie ekstraktach z herbat zielonych katechiny stanowią średnio 80% całkowitej zawartości związków polifenolowych. Spośród wszystkich katechin zawartość galusanu epigalokatechiny oraz epigalokatechiny stanowi łącznie od 55% w ekstraktach C i D do 80% w ekstrakcie A ogólnej zawartości katechin (rysunek 10). Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku 10, zawartość poszczególnych katechin w badanych ekstraktach można uszeregować następująco: EGCG >EGC >ECG ≥ EC >(C) >GC >GCG. Podobne wyniki uzyskali Arts M. i współpracownicy [2002] oraz Henning i współpracownicy [2003]. Jednakże, na podstawie wyników badań Gramza i współpracownicy [2006] uszeregowali katechiny, według ich procentowego udziału

w całkowitej zawartości katechin, następująco: EGC > EGCG > ECG > EC > C. W toku niniejszych pracy odmienny udział katechin w całkowitej ich zawartości zaobserwowano jedynie w ekstrakcie C. Herbata C charakteryzuje się wyższą zawartością galusanu epikatechiny (ECG) niż epigalokatechiny (EGC). Rozbieżności wyników badań (różnych autorów) nad zawartością poszczególnych katechin w wodnych ekstraktach z herbat zielonych dowodzą, po raz kolejny, że jakość i ilość ekstrahowanych do naparu katechin występujących w herbacie zielonej zależy od gatunku herbaty oraz sposobu przygotowania ekstraktu (czasu i temperatury parzenia oraz rodzaju rozpuszczalnika do ekstrakcji) i może być różna w różnych herbatach.



Rysunek 10. Procentowy udział poszczególnych katechin w ogólnej zawartości katechin w wodnych ekstraktach z herbat zielonych (n=3). Wykres sporządzony na podstawie wyników zawartych w tabeli 10. Badane katechiny oznaczono następującymi skrótami: katechina (C), epikatechina (EC), epigalokatechina (EGC), galokatechina (GC), galusan galokatechiny (GCG), galusan epikatechiny (ECG) i galusan epigalokatechiny (EGCG).

W kolejnym etapie badań oznaczono aktywność przeciwutleniającą ekstraktów z herbat oraz określono wpływ zawartości związków polifenolowych, jak i zawartości poszczególnych katechin na aktywność przeciwutleniającą badanych ekstraktów. Do badań aktywności przeciwutleniającej herbat zielonych wykorzystano zmodyfikowaną metodę TEAC oraz metodę DPPH. W badaniach posłużono się dwiema różnymi metodami, ponieważ warunki reakcji i rodzaj substratów mogą mieć wpływ na otrzymane wyniki. Obie metody

pozwalają na pomiar aktywności zarówno związków modelowych, jak i mieszanin związków biologicznie czynnych, takich jak ekstrakty roślinne, napoje i soki.

W tabeli 11 przedstawiono wartości TEAC badanych ekstraktów wyznaczone za pomocą zmodyfikowanej metody TEAC oraz wartości $TEAC_{(DPPH)}$ wyznaczone metodą DPPH. W celu porównania aktywności przeciwutleniającej DPPH z danymi literaturowymi obliczono i przedstawiono w tabeli 11 również stężenia ekstraktów, przy których obserwuje się 50-procentowy spadek aktywności rodnika DPPH* (IC_{50}).

Tabela 11. Wartości TEAC wodnych ekstraktów z herbat zielonych wyznaczone zmodyfikowaną metodą TEAC (n=3) oraz wartości $TEAC_{(DPPH)}$ i IC_{50} badanych ekstraktów oznaczone metodą DPPH (n=3)

Ekstrakt	TEAC (pH 7,4) [mM]	$TEAC_{(DPPH)}$ [μ M/g ekstraktu]	IC_{50} [μ g/ml]
A	3,65 \pm 0,07 ^b	247,74 \pm 1,43 ^b	8,177 \pm 0,05 ^b
B	2,95 \pm 0,04	196,49 \pm 1,72 ^c	10,310 \pm 0,09 ^c
C	4,72 \pm 0,25 ^a	345,78 \pm 1,43 ^a	5,858 \pm 0,00 ^a
D	4,76 \pm 0,05 ^a	359,15 \pm 19,19 ^a	5,648 \pm 0,30 ^a
E	4,75 \pm 0,22 ^a	315,80 \pm 2,00 ^a	6,414 \pm 0,04 ^a
F	3,63 \pm 0,08 ^b	217,15 \pm 12,03 ^{bc}	9,343 \pm 0,52 ^{bc}

^{a,b,c} brak istotnych różnic pomiędzy próbkami, test t-Studenta ($p < 0,05$)

Na podstawie wyników zawartych w tabeli 11 stwierdzono, że aktywność przeciwutleniająca herbat jest wysoka, porównywalna z aktywnością przeciwutleniającą niektórych katechin [Rice-Evans et al. 1996]. Wyniki badań dotyczące aktywności przeciwutleniających herbat zielonych oznaczonych metodami TEAC oraz DPPH są zgodne z danymi literaturowymi [Salah et al. 1995, Ohmori et al. 2005, Yokozawa et al. 1998].

Aktywność przeciwutleniająca poszczególnych herbat różni się. Najwyższą aktywność przeciwutleniającą wykazują ekstrakty C, D i E, charakteryzujące się również najwyższą zawartością związków polifenolowych. Aktywność TEAC tych ekstraktów jest średnio około 30% wyższa niż ekstraktów A i F i około 60% wyższa niż aktywność ekstraktu B. Podobnie kształtują się różnice aktywności poszczególnych ekstraktów oszacowane na podstawie parametru $TEAC_{(DPPH)}$. Powyższe obserwacje znajdują potwierdzenie w analizie współczynników korelacji dla zależności pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą TEAC

badanych ekstraktów a aktywnością wyznaczoną metodą DPPH ($R = 0,961$ dla parametrów TEAC i $TEAC_{(DPPH)}$) oraz $R = 0,980$ dla parametrów TEAC i IC_{50}).

W oparciu o otrzymane wyniki stwierdzono istnienie liniowej zależności między wartościami TEAC oraz $TEAC_{(DPPH)}$ a ogólną zawartością związków polifenolowych w ekstraktach z badanych herbat zielonych. Współczynniki korelacji tych zależności wynoszą, odpowiednio, $R = 0,949$ ($p = 0,004$) i $R = 0,929$ ($p = 0,007$), co potwierdza wcześniejsze obserwacje innych autorów [Henning et al. 2003, Horžić et al. 2009, Rusak et al. 2008].

Na podstawie wyników niniejszych badań stwierdzono, że katechiny stanowią około 80% całkowitej zawartości związków polifenolowych we wszystkich badanych ekstraktach z herbat. Współczynniki korelacji dla zależności między aktywnością przeciwutleniającą TEAC oraz $TEAC_{(DPPH)}$ a zawartością katechin ogółem wynoszą, odpowiednio, $R = 0,886$ ($p = 0,018$) i $R = 0,883$ ($p = 0,019$).

Z porównania wartości TEAC badanych ekstraktów z literaturowymi wartościami TEAC (pH 7,4) poszczególnych katechin [Rice-Evans et al. 1996], przy uwzględnieniu zawartości tych związków w ekstraktach, stwierdzono, że udział katechin w aktywności przeciwutleniającej herbat zielonych wynosi średnio 80%. Pozostałe 20% jest wynikiem obecności innych związków fenolowych, takich jak kofeina i kwas galusowy, których łączna zawartość w badanych ekstraktach, wyznaczona metodą HPLC, wynosiła średnio 70 mg/g ekstraktu. Według danych literaturowych od 78% do 93% aktywności przeciwutleniającej herbat zielonych można przypisać katechinom [Arts M. et al. 2002, Rice-Evans et al. 1996].

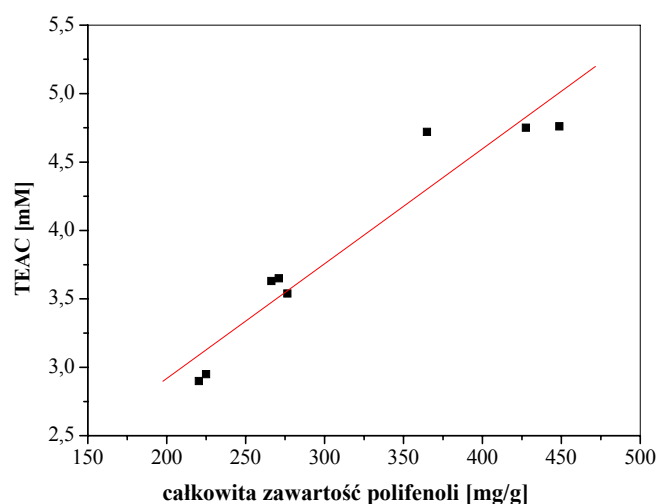
Analizując wpływ zawartości poszczególnych katechin w badanych ekstraktach (tabela 10, rysunek 10) na aktywność przeciwutleniającą TEAC herbaty zielonej, wysoki współczynnik korelacji zaobserwowano jedynie dla epikatechiny ($R = 0,931$, $p = 0,007$) oraz galusanu epigalokatechiny ($R = 0,851$, $p = 0,03$). Dla pozostałych katechin stwierdzono brak istotnej zależności aktywności przeciwutleniającej TEAC ekstraktów od zawartości poszczególnych katechin. Podobne wyniki uzyskano biorąc pod uwagę zdolność zmiatania rodników DPPH \cdot i zawartość poszczególnych katechin w ekstraktach.

10.2. Wartość TEAC jako parametr do oceny jakości ekstraktów z herbat zielonych

W dalszej części pracy zbadano możliwość wykorzystania parametru TEAC do oceny jakości ekstraktów z herbat. Część wyników badań, w których brała udział autorka, została opublikowana [Muzolf et al. 2007b].

Na rysunku 11 przedstawiono liniową zależność aktywności przeciwutleniającej TEAC wodnych ekstraktów z herbat zielonych od ogólnej zawartości w nich związków polifenolowych.

Wysoki współczynnik korelacji ($R = 0,958$) dla zależności pomiędzy wartościami TEAC badanych herbat i ogólną zawartością w nich związków polifenolowych wskazuje, że czynnikiem decydującym o aktywności przeciwutleniającej TEAC herbat jest zawartość związków polifenolowych. Na podstawie równania prostej tej zależności ($TEAC = 0,00788 \cdot TPC + 1,4464$) oszacowano zawartość związków polifenolowych w badanych ekstraktach. Wyniki obliczeń przedstawiono w tabeli 12.



Rysunek 11. Zależność aktywności przeciwutleniającej TEAC ekstraktów z herbat zielonych od ogólnej zawartości w nich związków polifenolowych; współczynnik korelacji $R = 0,958$, $p = 0,0002$. Wykres sporządzono na podstawie danych zawartych w tabelach 10 i 11 oraz danych literaturowych [Muzolf et al. 2007b].

Różnice pomiędzy obliczoną a eksperymentalnie wyznaczoną całkowitą zawartością związków nie przekraczają 6% dla ekstraktów A, D, E i F. Błędy oszacowania dla ekstraktów B i C są wyższe i wynoszą odpowiednio 15% i 14%.

Tabela 12. Całkowita zawartość związków polifenolowych oszacowana na podstawie równania zależności przedstawionej na rysunku 11 ($TEAC = 0,00788 \cdot TPC + 1,4464$)

Ekstrakt	Oszacowana całkowita zawartość związków polifenolowych [mg/g ekstraktu]	Błąd oszacowania [%]
<i>A</i>	279,6	3
<i>B</i>	190,8	15
<i>C</i>	415,4	14
<i>D</i>	420,5	6
<i>E</i>	419,2	2
<i>F</i>	277,1	4

Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że z wyznaczonej zależności aktywności przeciwutleniającej TEAC ekstraktów z herbat zielonych liściastych od zawartości w nich związków polifenolowych można z dobrym przybliżeniem oszacować zawartość związków polifenolowych w herbatach zielonych liściastych różnych marek, pod warunkiem zachowania tych samych warunków ekstrakcji (czasu i temperatury parzenia liści oraz rodzaju rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji).

Zawartość związków polifenolowych uznaje się obecnie jako wyróżnik jakości wielu produktów, takich jak np. owoce i warzywa, soki i napoje owocowe i owocowo-warzywne, a także herbaty [Gliszczyńska-Świągło & Tyrakowska 2003, Gliszczyńska-Świągło et al. 2006, Klimczak et al. 2007]. Zawartość związków polifenolowych w tych produktach oznacza się najczęściej metodą HPLC, która jest czasochłonna i generuje duże koszty. Alternatywę dla tej metody może stanowić, szybka i łatwa w wykonaniu, metoda TEAC. Ponieważ wartość TEAC zależy bezpośrednio od zawartości związków polifenolowych, parametr TEAC można zaproponować jako jeden z elementów oceny towaroznawczej herbat zielonych oraz jej ekstraktów. Wiedza na temat aktywności przeciwutleniającej miałaby istotne znaczenie dla producentów żywności stosujących ekstrakty z herbat zielonych jako przeciwutleniacze

naturalne dodawane do produktów w celu ochrony ich składników przed utlenianiem. Co więcej sam parametr TEAC, umieszczany na etykiecie produktu, mógłby być istotną informacją dla konsumentów umożliwiającą im podjęcie decyzji odnośnie zakupu danej herbaty zielonej. Podsumowując, wartość TEAC można zaproponować jako jeden z elementów oceny towaroznawczej herbat zielonych i jej ekstraktów.

10.3. Wpływ pH środowiska na aktywność przeciwutleniającą TEAC wodnych ekstraktów z herbat zielonych

Wpływ pH środowiska na aktywność przeciwutleniaczy jest istotny ze względu na ich reakcje w organizmie. Odczyn pH przewodu pokarmowego człowieka zmienia się w szerokim zakresie: od pH 1,0 w żołądku, przez pH 5,3 w jelicie cienkim, pH 6,8 śliny, pH 7,4 ludzkich tkanek i płynów ustrojowych, pH 8 w jelicie grubym, pH 7 – 8,7 w trzustce, do pH 8,3 – 9,3 w dwunastnicy [Grzymisławski 2000]. Również pH żywności może zmieniać aktywność zawartych w niej przeciwutleniaczy, co może mieć istotne znaczenie dla technologicznego wykorzystania naturalnych przeciwutleniaczy polifenolowych w ochronie jakości żywności. Bogatym i stosunkowo niedrogim źródłem polifenoli jest herbata zielona, która dzięki swym pro-zdrowotnym właściwościom zyskuje coraz większą popularność wśród konsumentów. Obecnie prowadzone są intensywne badania nad zastosowaniem ekstraktów z herbaty zielonej do ochrony jakości produktów spożywczych takich jak mięso, masło, oleje roślinne [Gramza et al. 2006, Gramza-Michałowska 2007b, Mitsumoto et al. 2005, Tang et al. 2002, 2006]. Ze względu na to, że wartości pH produktów spożywczych są różne (np. pH mięsa wołowego około 5,3 – 5,6, wieprzowego 5,6 – 6,0, pH plazmy masła 4,5 – 6,9) wiedza na temat wpływu pH środowiska na aktywność przeciwutleniającą ekstraktów z herbat zielonych umożliwi określenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktu w danym produkcie.

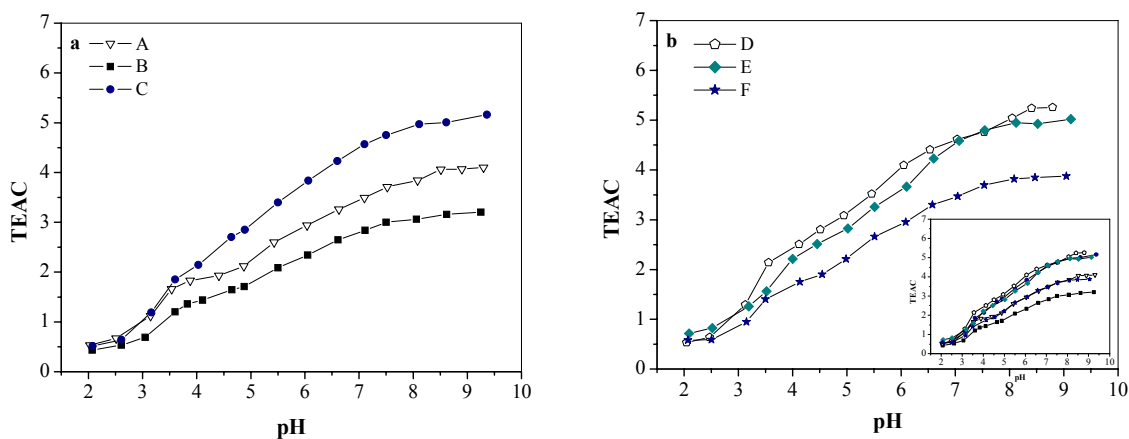
W dotychczasowej literaturze dostępne są wartości parametrów TEAC lub ORAC charakteryzujących aktywność przeciwutleniającą herbat zielonych w roztworach o wartości pH równej 7,4 lub pH 5,5 [Rusak et al. 2008, Salah et al. 1996]. Brak natomiast danych dotyczących właściwości przeciwutleniających herbat w szerokim zakresie pH. Dlatego w niniejszej pracy podjęto badania nad określeniem wpływu pH środowiska na aktywność przeciwutleniającą ekstraktów z herbat zielonych liściastych. Pomiary aktywności przeciwutleniających ekstraktów z herbat przeprowadzono za pomocą zmodyfikowanej

metody TEAC w zakresie pH 2,0 – 9,5. Uzyskanie wiarygodnych wyników w pH powyżej 9,5 było niemożliwe ze względu na nietrwałość kationorodnika ABTS^{•+}.

Rysunek 12 przedstawia zależności aktywności przeciwutleniającej TEAC wodnych ekstraktów z herbat zielonych różnych marek (oznaczonych symbolami: A, B, C, D, E i F) od pH środowiska. Dla porównania krzywych zależności aktywności przeciwutleniającej wszystkich ekstraktów z herbat od pH zebrano je na jednym wykresie w okienku rysunku 12 b.

Aktywność przeciwutleniająca Troloksu, zastosowanego jako wzorca, nie ulega zmianie pod wpływem zmian pH środowiska i jest równa jedności w całym badanym zakresie wartości pH.

Na podstawie krzywych obrazujących zależność aktywności przeciwutleniającej od pH można stwierdzić, że pH środowiska ma istotny wpływ na wartości TEAC badanych ekstraktów z herbat. Wraz ze wzrostem wartości pH aktywność przeciwutleniająca TEAC ekstraktów rośnie. Efekt ten występuje w zakresie pH odpowiadającym fizjologicznym wartościom pH ludzkich tkanek i płynów ustrojowych, jak również w zakresie pH produktów spożywczych, takich jak np. mięso czy masło, w których dodatek ekstraktu spełnia rolę naturalnego przeciwutleniacza zapobiegającego procesom utleniania składników żywności.



Rysunek 12. Wpływ pH na wartość TEAC wodnych ekstraktów z herbat zielonych (A, B, C, D, E i F). Okienko na rysunku b) przedstawia jednocześnie wszystkie zależności wartości TEAC badanych ekstraktów z herbat od pH środowiska

Z danych przedstawionych na wykresie wynika, że aktywność przeciwutleniająca wszystkich ekstraktów w przedziale pH 2,0 – 2,5 jest porównywalna i nie przekracza wartości

TEAC = 1. Powyżej pH 2,5 aktywność przeciwutleniająca TEAC ekstraktów rośnie, przy czym w zakresie pH od 2,5 do 3,5 następuje gwałtowny wzrost wartości TEAC, o około 1,5 jednostki w przypadku wszystkich ekstraktów z herbat.

Największą aktywność przeciwutleniającą spośród badanych herbat wykazują ekstrakty z herbat C, D i E. W zakresie pH 3,5 – 9,0 wartości TEAC tych ekstraktów są wyższe średnio o 30% w porównaniu do odpowiednich wartości TEAC ekstraktów A i F i o 60% w porównaniu do wartości TEAC ekstraktu B.

Z dotychczasowych badań nad aktywnością przeciwutleniającą hydroksyflawonów i antocyjanów wynika, że wzrost wartości TEAC tych związków wraz ze wzrostem pH środowiska jest wynikiem deprotonacji najłatwiej dysocjujących grup hydroksylowych obecnych w badanych polifenolach [Borkowski et al. 2005, Lemańska et al. 2001]. Katechiny występujące w zielonej herbacie również posiadają w swej strukturze dużą liczbę łatwo dysocjujących grup hydroksylowych. Zatem obserwowany wzrost wartości TEAC badanych ekstraktów z herbat zielonych może być spowodowany wzrostem aktywności przeciwutleniającej katechin po ich deprotonacji. W celu wyjaśnienia tego problemu przeprowadzono dalsze badania nad czynnikami determinującymi właściwości przeciwutleniające katechin.

11. Czynniki wpływające na aktywność przeciwutleniającą katechin

Z danych literaturowych wynika, że istnieje zależność pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą katechin a ich strukturą [Salah et al. 1995, Nanjo et al. 1996, 1999]. Wielu autorów twierdzi, że ze względu na specyficzną budowę katechin (brak podwójnego wiązania pomiędzy atomami węgla w pozycji C2 i C3 i grupy karbonylowej w pozycji C4 w pierścieniu C) zasadniczy wpływ na ich właściwości przeciwutleniające ma liczba i rozmieszczenie grup hydroksylowych w cząsteczce. W dotychczasowych badaniach nad właściwościami przeciwutleniającymi katechin nie brano pod uwagę innych czynników, takich jak pH środowiska i właściwości kwasowo-zasadowe związków, które w istotny sposób mogą wpływać na aktywność katechin.

11.1. Wpływ pH środowiska na aktywność przeciwutleniającą katechin

W pierwszym etapie badań wyznaczono wartości TEAC wybranych katechin w pH = 7,4 przy użyciu zmodyfikowanej metody TEAC. Otrzymane wyniki porównano z literaturowymi wartościami TEAC wyznaczonymi oryginalną metodą opracowaną przez Miller'a i współpracowników [1993] i przedstawiono w tabeli 13. Na podstawie wyników zawartych w tabeli 13 stwierdzono, że istnieje liniowa zależność między wartościami TEAC katechin wyznaczonymi w toku niniejszych badań i literaturowymi wartościami TEAC. Zaobserwowana korelacja jest statystycznie istotna; współczynnik korelacji jest wysoki i wynosi $R = 0,913$ ($p = 0,03$).

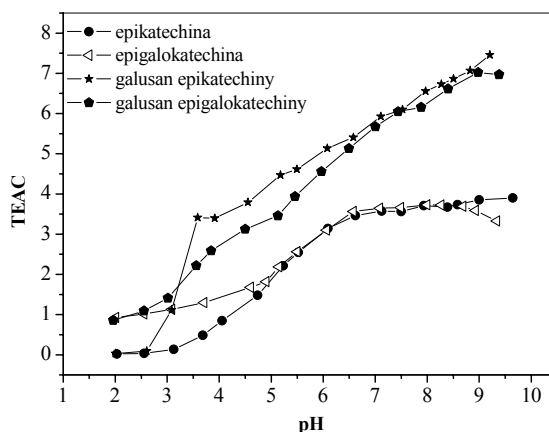
Tabela 13. Wartości TEAC wyznaczone za pomocą zmodyfikowanej metody oraz literaturowe wartości TEAC [Rice-Evans et al. 1996] katechin

Katechiny	TEAC (pH 7,4)	TEAC lit. (pH 7,4)
Katechina	$3,22 \pm 0,08$	$2,40 \pm 0,05$
Epikatechina	$3,52 \pm 0,12$	$2,50 \pm 0,02$
Epigalokatechina	$3,61 \pm 0,10$	$3,82 \pm 0,06$
Galokatechina	$3,42 \pm 0,06$	-
Galusan epikatechiny	$6,12 \pm 0,10$	$4,93 \pm 0,02$
Galusan epigalokatechiny	$6,01 \pm 0,20$	$4,75 \pm 0,06$
Galusan galokatechiny	$4,80 \pm 0,09$	-
Galusan metylu	$2,20 \pm 0,04$	$2,44 \pm 0,03$

Na rysunku 13 przedstawiono wyznaczone doświadczalnie zależności aktywności przeciwutleniającej TEAC wybranych katechin występujących w herbatach zielonych od pH środowiska. Dla porównania wykres zamieszczony na rysunku 14 obrazuje wpływ pH na wartości TEAC galusanu metylu użytego w badaniach jako związek modelowy, zawierający w swej strukturze resztę kwasu galusowego.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że aktywność przeciwutleniająca TEAC katechin, podobnie jak aktywność ekstraktów z herbat, wzrasta

wraz ze wzrostem wartości pH. Podobną zależność aktywności przeciwutleniającej ze wzrostem pH stwierdzono dla kwasów fenolowych, hydroksyflawonów i antocyjanów [Borkowski et al. 2005, Lemańska et al. 2001, Tyrakowska et al. 1999, 2003]. Ponadto z przedstawionych na rysunku 13 zależności wynika, że zdolność galusanów katechin do wygaszania kationorodnika ABTS^{•+} jest wyższa, prawie w całym badanym zakresie pH, od aktywności epikatechiny i epigalokatechiny.



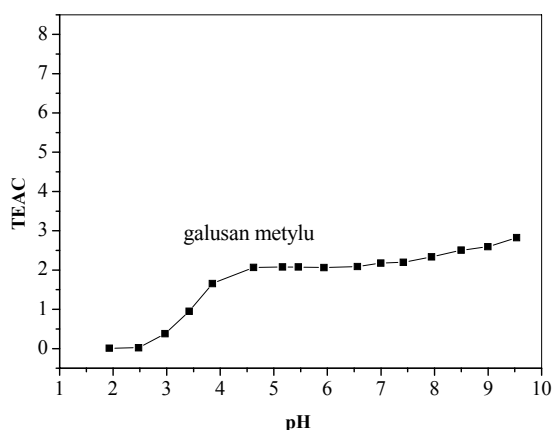
Rysunek 13. Zależność aktywności przeciwutleniającej TEAC od pH dla wybranych katechin podstawionych grupą katecholową (epikatechyna) lub pyrogalolową (epigalokatechyna) oraz grupą katecholową lub pyrogalolową i resztą kwasu galusowego (odpowiednio galusan epikatechiny i galusan epigalokatechiny)

Porównując aktywność przeciwutleniającą TEAC epikatechiny, posiadającej ugrupowanie katecholowe, z aktywnością epigalokatechiny posiadającej ugrupowanie pyrogalolowe stwierdzono, że obecność dodatkowej grupy hydroksylowej w pierścieniu B epigalokatechiny powoduje wzrost aktywności przeciwutleniającej TEAC tego związku w zakresie pH 2,0 – 4,5. Jednak, w zakresie pH 5,0 – 9,5, obecność dodatkowej grupy hydroksylowej, tworzącej ugrupowanie pyrogalolowe, nie ma wpływu na aktywność przeciwutleniającą TEAC analizowanych katechin. Analogicznie aktywność przeciwutleniająca TEAC galusanu epigalokatechiny, posiadającego trzy grupy hydroksylowe w pierścieniu B w pozycjach 3',4',5'-triOH, jest wyższa w kwaśnym pH (w zakresie 2,0 – 3,0) od aktywności galusanu epikatechiny. Na podstawie powyższych obserwacji można wysunąć wniosek, że dodatkowa grupa hydroksylowa w pozycji 5'-OH, dzięki której

w cząsteczce tworzy się ugrupowanie pyrogalolowe powoduje wzrost aktywności przeciwutleniającej TEAC katechiny w środowisku o odczynie kwaśnym.

Obecność ugrupowania pyrogalolowego w pierścieniu B już wcześniej była brana pod uwagę jako czynnik powodujący wzrost aktywności przeciwutleniającej TEAC katechin [Rice-Evans et al. 1996, Salah et al. 1995]. Wyniki badań Nanjo i współpracowników [1996] nad zdolnością katechin do wygaszania rodnika DPPH[•], które wykazały, że obecność ugrupowania pyrogalolowego w cząsteczce katechiny powoduje wzrost aktywności przeciwutleniającej związku w pH 4,0, w porównaniu do aktywności katechin z grupą katecholową, są potwierdzeniem wyników uzyskanych w toku niniejszej pracy.

Na podstawie wyników badań przedstawionych na rysunku 13 stwierdzono również, że galusan epikatechiny i galusan epigalokatechiny charakteryzują się znacznie wyższą aktywnością przeciwutleniającą TEAC niż epikatechyna i epigalokatechyna w całym zakresie pH powyżej 2,5. Ponadto w przypadku galusanu epikatechiny oraz, w mniejszym stopniu, galusanu epigalokatechiny, obserwuje się gwałtowny wzrost wartości TEAC w zakresie pH 2,5 – 3,5, po czym w zakresie pH 4,0 – 9,5 wartości TEAC związków rosną stopniowo wraz ze wzrostem wartości pH. Analizując zależność aktywności przeciwutleniającej galusanu metylu od pH (przedstawioną na rysunku 14) również obserwuje się gwałtowny wzrost wartości TEAC w kwaśnym pH, w zakresie 2,5 – 4,0, po czym w zakresie pH 4,5 – 7,5 wartości TEAC związku nie ulegają istotnym zmianom.



Rysunek 14. Wpływ pH środowiska na wartości TEAC galusanu metylu – związku modelowego zawierającego resztę kwasu galusowego w cząsteczce

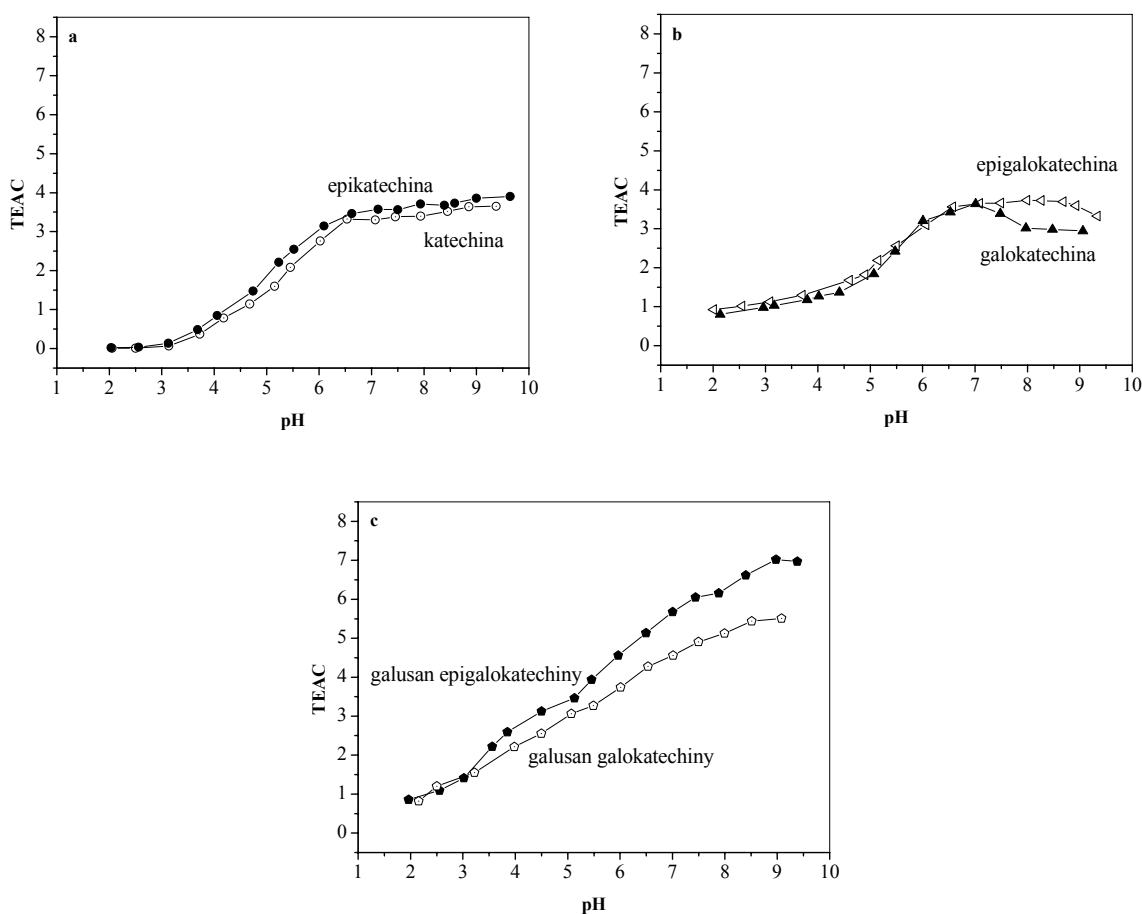
Badania wpływu pH na aktywność przeciwutleniającą hydroksyflawonów wykazały, że wzrost aktywności przeciwutleniającej 3- i 5-hydroksyflawonu wraz ze wzrostem pH jest spowodowany lepszą rozpuszczalnością tych związków [Lemańska et al. 2001]. Dlatego w celu sprawdzenia przyczyny gwałtownego wzrostu w kwaśnym pH aktywności przeciwutleniającej TEAC katechin posiadających resztę kwasu galusowego oraz galusanu metylu, określono wpływ pH na rozpuszczalność tych galusanów. Ponieważ wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły wykluczyć wpływ pH na rozpuszczalność badanych galusanów epikatechiny i epigalokatechiny oraz galusanu metylu zmianą rozpuszczalności nie można wyjaśnić względnie silnego obniżenia aktywności przeciwutleniającej galusanów epigalokatechiny i epikatechiny przy niskich wartościach pH. Efekt ten może być również spowodowany protonowaniem grupy karbonylowej $O-C=O$ (obecnej w cząsteczkach galusanów) przy niskich wartościach pH. Można przypuszczać, że protonowanie cząsteczek obu galusanów może znacznie zmniejszyć ich zdolność do oddawania elektronu lub atomu wodoru. W dotychczasowej literaturze brak danych dotyczących właściwości zasadowych (wartości pK_b) estrów kwasu galusowego w oparciu, o które możnaby potwierdzić powyżej przedstawioną hipotezę. Jednakże wpływu protonowania grup karbonylowych obu galusanów katechin przy niskich wartościach pH nie można wykluczyć i kwestia ta będzie przedmiotem szczegółowej analizy w rozdziale 11.3.2. Z uwagi na fakt, że takie protonowanie nie może zachodzić w cząsteczkach badanych katechin nie zawierających reszty kwasu galusowego, dla których nie zaobserwowano takiej ostrej zmiany aktywności przeciwutleniającej przy niskich wartościach pH, dalszą analizę porównawczą przeprowadzono w zakresie wartości $pH > 3,5$, w którym różne katechiny będą się zachowywać podobnie pod względem chemicznym. Na podstawie analizy zależności wartości TEAC od pH (powyżej pH 3,5) można wysunąć wniosek, że reszta kwasu galusowego przyłączona w pozycji C3 katechiny powoduje wzrost aktywności przeciwutleniającej TEAC związku w zakresie pH powyżej 3,5. Część wyników badań, w których brała udział autorka została opublikowana [Muzolf et al. 2008].

Interesujące wyniki uzyskano również analizując epimery badanych katechin. Na rysunku 15 przedstawiono wyznaczone doświadczalnie zależności aktywności przeciwutleniającej TEAC badanych katechin i ich epimerów występujących w herbatach zielonych od pH środowiska.

Można zaobserwować, że epikatechina i jej epimer katechina (rysunek 15 a) wykazują bardzo zbliżoną aktywność w całym zakresie pH. Brak istotnych różnic pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą tych związków w całym badanym zakresie pH może wynikać

z ich struktury, która różni się jedynie konfiguracją przestrzenną przy atomie węgla C3 pierścienia C.

Z porównania zależności aktywności przeciwutleniającej TEAC epigalokatechiny i galokatechiny (przedstawionych na rysunku 15 b) wynika, że epigalokatechina w zakresie pH 2,0 – 7,0 wykazuje podobne wartości TEAC jak jej epimer galokatechina. Powyżej pH 7,0 aktywność przeciwutleniająca galokatechiny ulega obniżeniu. Wartość TEAC galokatechiny w pH 8,5 jest o 0,7 jednostki mniejsza niż wartość TEAC epigalokatechiny i wynosi TEAC = 2,95.



Rysunek 15. Wpływ pH na wartość TEAC katechin: a) epimerów: epikatechiny i katechiny, b) epimerów: epigalokatechiny i galokatechiny, c) epimerów: galusanu epigalokatechiny i galusanu galokatechiny

W celu wyjaśnienia przyczyny obniżenia aktywności przeciwutleniającej galokatechiny w pH > 7,0 przeprowadzono, metodą HPLC, badania stabilności związku w zasadowym pH. Na podstawie otrzymanej zależności powierzchni piku galokatechiny

od czasu retencji stwierdzono, że stabilność galokatechiny w pH 7,4, w ciągu 6 minut pomiaru aktywności TEAC, maleje o około 3% podczas gdy w pH 8,5 maleje o 10%. Jednocześnie dostępne w literaturze wyniki badań spektroskopowych nad stabilnością związków fenolowych w buforach o pH 7,0 – 11,0 wskazują, że epigalokatechina jest stabilna w roztworach o zasadowym pH [Friedman & Jürgens 2000]. Dlatego biorąc pod uwagę wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy oraz dane literaturowe dotyczące stabilności katechin można stwierdzić, że obserwowany spadek aktywności przeciwutleniającej galokatechiny w pH >7,0 w porównaniu do epigalokatechiny wynika z mniejszej stabilności galokatechiny w roztworach o wysokich wartościach pH.

Kolejną parą epimerów wśród badanych katechin są galusan epigalokatechiny i galusan galokatechiny. Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku 15 c) można stwierdzić brak istotnych różnic pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą tych związków w zakresie pH 2,0 – 3,5. Powyżej pH 3,5 aktywność przeciwutleniająca galusanu epigalokatechiny jest wyższa niż aktywność galusanu galokatechiny. W miarę wzrostu wartości pH powyżej 3,5 różnice pomiędzy wartościami TEAC obu galusanów (przy danym pH) są coraz większe. W pH 8,5 aktywność przeciwutleniająca TEAC galusanu epigalokatechiny jest o 1,3 jednostki wyższa niż aktywność galusanu galokatechiny, podczas gdy w pH 4,0 różnica ta wynosi zaledwie 0,5 jednostki. Ponieważ wartości pKa obu związków są zbliżone (rozdział 11.2., tabela 14), należy wykluczyć wpływ ewentualnych różnic w deprotonacji omawianych galusanów na ich aktywność przeciwutleniającą w określonym pH. Wyjaśnienie przyczyny coraz niższej, wraz ze wzrostem pH powyżej 3,5, aktywności przeciwutleniającej galusanu galokatechiny w porównaniu do galusanu epigalokatechiny będzie przedmiotem szczegółowej analizy w dalszej części pracy (rozdział 11.3.2.).

W dotychczasowej literaturze brak szczegółowych danych na temat aktywności przeciwutleniającej epimerów katechin. Z badań przedstawionych w pracy wynika, że konfiguracja przestrzenna nie ma istotnego wpływu na aktywność przeciwutleniającą epimerów katechin. Zależności aktywności przeciwutleniającej TEAC katechin od pH środowiska dla poszczególnych epimerów (katechina i epikatechina oraz galokatechina i epigalokatechina) są porównywalne. Konfiguracja przestrzenna nie tłumaczy również zaobserwowanych różnic między wartościami TEAC galusanu epigalokatechiny i jego epimeru ponieważ przy wartościach pH < 3,5 wartości TEAC obu galusanów są bardzo zbliżone.

11.2. Wpływ właściwości kwasowo-zasadowych na aktywność przeciwutleniającą katechin

Katechiny, podobnie jak inne flawonoidy, posiadają dużą liczbę grup hydroksylowych w cząsteczkach, które mogą ulegać dysocjacji w fizjologicznym zakresie pH. Deprotonacja grup OH może wywierać zasadniczy wpływ na aktywność przeciwutleniającą TEAC katechin. Podobne zjawisko obserwowano w przypadku hydroksyflawonów i kwasów fenolowych [Lemańska et al. 2001, Tyrakowska et al. 1999, 2003]. Zaobserwowany w toku niniejszej pracy wzrost aktywności przeciwutleniającej TEAC zarówno katechin, jak i ekstraktów z herbat zielonych bogatych w katechiny ze wzrostem pH wskazuje, że deprotonacja grup hydroksylowych może wpływać również na aktywność katechin. W dotychczas opublikowanych badaniach nie brano pod uwagę wpływu dysocjacji grup hydroksylowych na aktywność przeciwutleniającą katechin.

Badania wpływu dodatkowych grup OH na właściwości kwasowo-zasadowe i aktywność przeciwutleniającą TEAC katechin rozpoczęto od wyznaczenia wartości pKa badanych katechin. W tabeli 14 przedstawiono doświadczalne wartości pKa katechin dostępne w literaturze, jak i wyznaczone w toku niniejszych badań oraz literaturowe wartości energii deprotonacji (DE) najbardziej kwasowych grup hydroksylowych w cząsteczkach katechin.

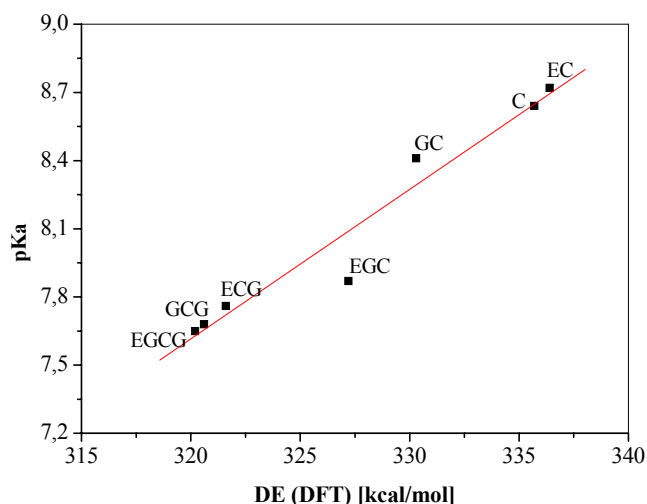
Na podstawie wartości pKa katechin potwierdzono, że dysocjacja ich grup hydroksylowych zachodzi w fizjologicznym zakresie pH. Wartości energii deprotonacji wskazują, że najłatwiej dysocjującymi grupami hydroksylowymi w cząsteczkach katechiny, epikatechiny, epigalokatechiny, galokatechiny oraz galusanu galokatechiny są grupy C3'-OH i/lub C4'-OH. Wprowadzenie do cząsteczki epikatechiny lub epigalokatechiny reszty kwasu galusowego powoduje zmianę preferencyjnego miejsca deprotonacji z grupy C4'-OH na C4''-OH.

Tabela 14. Doświadczalne i obliczone wartości pKa oraz literaturowe wartości energii deprotonacji (DE) katechin występujących w herbacie zielonej oraz galusanu metylu

Katechiny	pKa _{dośw.}	pKa [*] _{obl.}	DE ^e [kcal/mol]
Katechina	pKa ₁ 8,64 ^a 8,97 (B) ^b 8,68 ^c pKa ₂ 9,41 ^a 9,26 (A) ^b 9,70 ^c pKa ₃ 11,26 ^a 11,18(A) ^b 11,50 ^c pKa ₄ 13,26 ^a 13,25 (B) ^b	8,64	335,7 (4') 336,9 (3')
Epikatechina	pKa ₁ 8,72 ^a pKa ₂ 9,49 ^a pKa ₃ 11,23 ^a pKa ₄ 13,40 ^a	8,69	336,4 (3') 336,9 (4')
Epigalokatechina	pKa ₁ 7,73	8,08	327,2 (4') 331,4 (3')
Galokatechina	pKa ₁ 8,41 ^d	8,29	330,3 (4') ^d
Galusan epikatechiny	pKa ₁ 7,76	7,72	321,6 (3') 321,8 (4'')
Galusan epigalokatechiny	pKa ₁ 7,68 7,75 ^c pKa ₂ 8,0 ^c	7,65	320,6 (3') 321,6 (4'')
Galusan galokatechiny	pKa ₁ 7,65 ^d	7,62	320,2 (3') ^d 321,2 (4') ^d
Galusan metylu	pKa ₁ 7,92 8,03 ^c pKa ₂ 11,6 ^c	8,3	327,9 (4')

^a [Kennedy et al. 1984], ^b [Slabbert 1977], duże litery w nawiasach oznaczają pierścień A lub B cząsteczki katechiny, ^c [Herrero-Martinez et al. 2005], ^d [Muzolf-Panek et al. – artykuł w przygotowaniu], ^e [Jovanovic et al. 1995], ^e [Muzolf et al. 2008], liczby w nawiasach oznaczają numer atomu węgla związanego z najłatwiej dysocjującą grupą hydroksylową; * obliczeń wartości pKa dokonano na podstawie prostoliniowej zależności $pKa = 0,0662 \cdot DE - 13,648$

Ponadto na podstawie wyników przedstawionych w tabeli 14 stwierdzono, że istnieje liniowa zależność pomiędzy doświadczalnie wyznaczonymi wartościami pKa a teoretycznymi wartościami energii deprotonacji (DE). Współczynnik korelacji R wynosi 0,975 ($p = 0,0002$). Otrzymaną zależność przedstawiono na rysunku 16.



Rysunek 16. Zależność eksperymentalnych wartości pKa od literaturowych teoretycznych wartości energii deprotonacji DE ($R = 0,975$, $p = 0,0002$). Dla katechiny wykorzystano wartości pKa wyznaczone przez Kennedy i współpracowników [1984].

Warto podkreślić, że z równania powyższej zależności ($pKa = 0,0576 \cdot DE - 13,42761$) można obliczyć wartości pKa grup hydroksylowych innych katechin oraz wartości pKa związków o podobnej strukturze (jak np. galusan metylu), dla których brak w literaturze danych eksperymentalnych. Obliczone na podstawie równania otrzymanej krzywej wartości pKa badanych katechin, które również zamieszczono w tabeli 14, są zgodne z wartościami pKa wyznaczonymi doświadczalnie, co weryfikuje dokładność oznaczenia.

Na podstawie wyznaczonej zależności, wysunięto wniosek, że struktura katechin, w szczególności liczba i rozmieszczenie grup hydroksylowych, wyraźnie wpływa na ich wartości pKa. Dodatkowa grupa C5'-OH w pierścieniu B, dzięki której tworzy się ugrupowanie pyrogalolowe w epigalokatechinie i galusanie epigalokatechiny powoduje obniżenie wartości DE i pKa, w porównaniu do katechin zawierających grupę katecholową (epikatechiny oraz galusanu epikatechiny). Ponadto znaczny spadek wartości DE i pKa zaobserwowano w wyniku przyłączenia do cząsteczki epikatechiny, epigalokatechiny lub galokatechiny reszty kwasu galusowego.

W celu wyjaśnienia przyczyny wzrostu aktywności przeciwutleniającej TEAC katechin ze wzrostem pH porównano zależności wartości TEAC katechin od pH (rysunek 15) z wartościami pKa tych związków (tabela 14). Uzyskane wyniki wskazują, że wzrost aktywności TEAC wraz ze wzrostem pH jest wynikiem deprotonacji najłatwiej dysocjujących grup hydroksylowych (C3'-OH i C4'-OH lub C4''-OH). Potwierdzono w ten sposób

hipotezę, że aktywność przeciwutleniająca TEAC katechin wzrasta w wyniku deprotonacji najłatwiej dysocjujących grup hydroksylowych.

11.3. Wpływ struktury na właściwości przeciwutleniające katechin

Dotychczasowe badania nad wpływem struktury na aktywność przeciwutleniającą związków polifenolowych pozwoliły wyróżnić trzy charakterystyczne elementy strukturalne odpowiedzialne za ich wysoką aktywność przeciwutleniającą:

- 1) ugrupowanie katecholowe w pierścieniu B,
- 2) podwójne wiązanie pomiędzy atomami węgla C2 i C3 w połączeniu z grupą karbonylową w pozycji C4 oraz
- 3) dwie grupy hydroksylowe w pozycjach C5 i C7 [Rice-Evans et al. 1996, Rice-Evans & Miller 1998].

W cząsteczce katechin brak zarówno podwójnego wiązania, jak i grupy karbonylowej C4=O, dlatego uważa się, że wysoka aktywność tych związków w dużej mierze zależy od liczby grup hydroksylowych oraz od ich rozmieszczenia w cząsteczce katechiny [Salah et al. 1995, Rice-Evans et al. 1996]. Im większa liczba grup hydroksylowych tym wyższa aktywność przeciwutleniająca katechin.

11.3.1. Liczba i rozmieszczenie grup hydroksylowych w cząsteczkach katechin

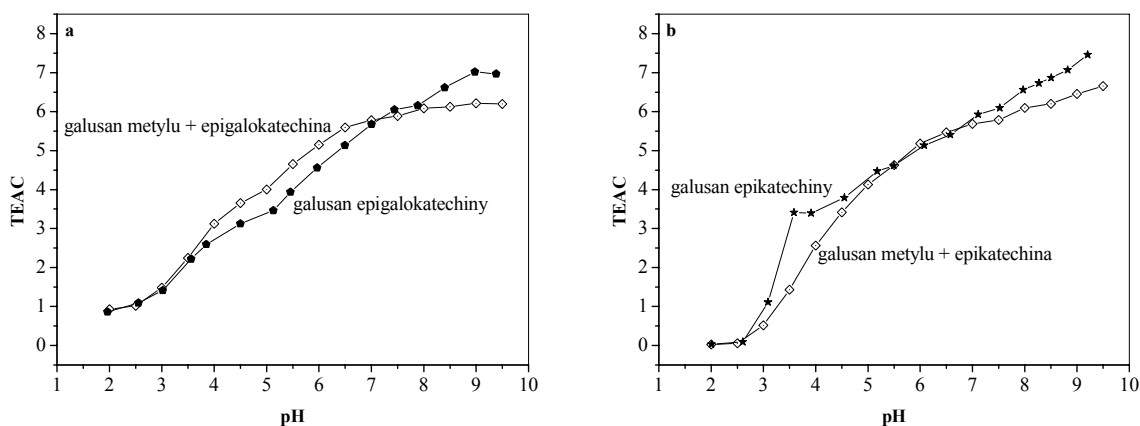
Wyniki badań przeprowadzonych w toku niniejszej pracy potwierdzają wpływ liczby grup OH na aktywność przeciwutleniającą katechin. Najwyższą aktywność przeciwutleniającą TEAC wykazują katechiny z największą liczbą grup hydroksylowych tj. galusany katechin. Współczynnik korelacji zależności wartości TEAC (pH 7,4) badanych katechin od liczby grup OH jest wysoki i wynosi $R = 0,822$ ($p = 0,02$).

Z danych literaturowych wynika także, że poza liczbą grup OH istotnym elementem determinującym aktywność przeciwutleniającą TEAC katechin jest obecność w ich cząsteczkach ugrupowań katecholowego lub pyrogalolowego oraz reszty kwasu galusowego. Liczne badania nad aktywnością przeciwutleniającą katechin pozwoliły uszeregować te charakterystyczne elementy struktury pod względem udziału w całkowitej aktywności przeciwutleniającej związku w następującej kolejności: reszta kwasu galusowego \geq grupa

pyrogalolowa > grupa katecholowa [Guo et al. 1999, Nanjo et al. 1996]. Na podstawie szczegółowej analizy wyników badań nad wpływem pH na aktywność przeciwutleniającą poszczególnych katechin, przedstawionych w poprzednim rozdziale (rozdział 11.1.), można wnioskować, że przede wszystkim reszta kwasu galusowego oraz w mniejszym stopniu grupa pyrogalolowa odpowiadają za wysoką aktywność TEAC katechin, co jest zgodne z wcześniejszymi sugestiami innych autorów. Ponadto stwierdzono, że reszta kwasu galusowego jest odpowiedzialna za wzrost aktywności katechin w zakresie wartości pH powyżej 3,5.

W celu wyjaśnienia przyczyny znacznie większej aktywności przeciwutleniającej galusanu epigalokatechiny i galusanu epikatechiny, w porównaniu z epigalokatechiną i epikatechiną, zsumowano wartości TEAC epigalokatechiny lub epikatechiny z wartościami TEAC galusanu metylu przy odpowiednich wartościach pH i porównano z eksperymentalnymi zależnościami wartości TEAC galusanów od pH.

Na rysunku 17 a) przedstawiono doświadczalnie wyznaczone zależności wartości TEAC od pH (profil wartości TEAC od pH) galusanu epigalokatechiny w zestawieniu z teoretycznym profilem wartości uzyskanym dla tego związku.



Rysunek 17. Zależność aktywności przeciwutleniającej TEAC od pH dla a) galusanu epigalokatechiny i krzywa teoretycznej zależności sumy wartości TEAC epigalokatechiny i galusanu metylu od pH oraz b) galusanu epikatechiny i krzywa teoretycznej zależności sumy wartości TEAC epikatechiny i galusanu metylu od pH środowiska

Z porównania eksperymentalnie wyznaczonej zależności wartości TEAC galusanu epigalokatechiny od pH z zależnością wyznaczoną teoretycznie dla tego związku wysunięto

wniosek, że wartości TEAC galusanu epigalokatechiny w całym zakresie pH mogą być uzyskane teoretycznie przez zsumowanie wartości TEAC epigalokatechiny i galusanu metylu. Wskazuje to na addytywny efekt przeciwutleniający dwóch niezależnych ugrupowań, pyrogalolowego i reszty kwasu galusowego, występujących w galusanie epigalokatechiny. Podobny wniosek można wysunąć dla galusanu epikatechiny na podstawie wyników przedstawionych na rysunku 17 b. Wyniki badań autorki wskazujące na addytywny efekt przeciwutleniający dwóch niezależnych ugrupowań (działających przeciwutleniająco) występujących zarówno w galusanie epigalokatechiny, jak i w galusanie epikatechiny jednoznacznie wyjaśniają, dlaczego ugrupowania pyrogalolowe i katecholowe oraz reszta kwasu galusowego mają kluczowe znaczenie dla aktywności przeciwutleniającej katechin. W oparciu o efekt addytywny dwóch niezależnych ugrupowań: pyrogalolowego i reszty kwasu galusowego w galusanie epigalokatechiny oraz katecholowego i reszty kwasu galusowego w galusanie epikatechiny można wyjaśnić przyczynę znacznie większej aktywności przeciwutleniającej tych związków w porównaniu do epigalokatechiny i epikatechiny obserwowanej w zakresie pH powyżej 3,5.

11.3.2. Zależność wartości TEAC katechin od parametrów molekularnych charakteryzujących ich zdolność do oddawania atomu wodoru lub elektronu

W celu wyjaśnienia wpływu dodatkowych grup hydroksylowych i ich deprotonacji na aktywność przeciwutleniającą TEAC badanych katechin wartości TEAC, wyznaczone w toku niniejszych badań, porównano z literaturowymi, obliczonymi teoretycznie wartościami energii dysocjacji wiązania O-H (BDE) oraz potencjałów jonizacji (IP) dla form neutralnych (N) i monoanionowych (A) katechin [Muzolf et al. 2008]. Wartości BDE oraz IP badanych katechin przedstawiono w tabeli 15.

Ogólnie uważa się, że związki polifenolowe mogą działać przeciwutleniająco poprzez mechanizm oddawania atomu wodoru lub/i elektronu cząsteczce rodnika [Lemańska et al. 2001, Rice-Evans et al. 1996, Tyrakowska et al. 1999].

Parametrem molekularnym odzwierciedlającym zdolność cząsteczki do oddawania atomu wodoru jest energia dysocjacji wiązania O-H (BDE – ang. *Bond Dissociation Energy*). BDE formy neutralnej definiuje się jako różnicę energii między rodnikiem powstałym

na skutek homolitycznej dysocjacji a cząsteczką obojętną związku. Im niższa wartość BDE tym większa zdolność związku do oddawania atomu wodoru.

Potencjał jonizacji (IP – ang. *Ionization Potential*) jest parametrem molekularnym charakteryzującym zdolność cząsteczki przeciwutleniacza do oddawania elektronu. IP formy neutralnej definiuje się jako różnicę energii między rodnikiem powstałym na skutek oderwania elektronu a cząsteczką obojętną związku. Im niższa wartość IP tym większa zdolność związku do oddawania elektronu.

Tabela 15. Wartości TEAC form neutralnych (N) katechin i literaturowe wartości energii dysocjacji wiązania O-H (BDE) oraz wartości potencjałów jonizacji (IP) formy neutralnej (N) i monoanionowej (A) katechin i galusanu metylu [Muzolf et al. 2008]

Katechiny	TEAC(N) dla pH=pKa - 2	BDE (N) ^a [kcal/mol]	IP (N) [eV]	BDE (A) ^{a,b} [kcal/mol]	IP (A) ^b [eV]
Katechina	3,32	81,0 (4')	171,0	80,1 (5) (C4'-O ⁻)	60,4 (C4'-O ⁻)
Epikatechina	3,48	80,9 (4')	168,7	79,4 (5) (C4'-O ⁻)	59,1 (C4'-O ⁻)
Epigalokatechina	2,8	71,7 (4')	164,6	77,5 (3') (C4'-O ⁻)	59,6 (C4'-O ⁻)
Galokatechina*	3,38	75,4 (4')	169,7	77,8 (3') (C4'-O ⁻)	60,3 (C4'-O ⁻)
Galusan epikatechiny	4,86	77,7 (4'')	166,8	76,1 (3'') (C4''-O ⁻)	70,9 (C4''-O ⁻)
Galusan epigalokatechiny	4,21	75,4 (4')	166,7	75,4 (4') (C4''-O ⁻)	71,1 (C4''-O ⁻)
Galusan galokatechiny*	3,40	76,0 (4')	168,4	76,3 (4') (C3'-O ⁻)	76,3 (C3'-O ⁻)
Galusan metylu	2,04	77,4 (4')	185,5	81,1(3') (C4'-O ⁻)	64,6 (C4'-O ⁻)

^a liczby w nawiasach określają numer atomu węgla, z którym związana jest grupa OH w cząsteczce, ^b oznaczenia w nawiasach dotyczą rodzaju monoanionu, * źródło: [Muzolf-Panek et al. – artykuł w przygotowaniu]

Dotychczasowe badania nad aktywnością przeciwutleniającą form neutralnych kwasów fenolowych wskazują na ich działanie przeciwutleniające poprzez mechanizm oddawania atomu wodoru [Tyrakowska et al. 1999]. Porównując wartości BDE(N) katechin obliczone dla najsłabszego wiązania O-H z wartościami TEAC ich form obojętnych (wartość TEAC przy $\text{pH} = \text{pKa} - 2$) nie stwierdzono między tymi parametrami istotnej ilościowej zależności. Wartość BDE(N) galusanu epikatechiny jest niższa niż wartość BDE(N) epikatechiny, co tłumaczyłoby wyższą aktywność przeciwutleniającą TEAC galusanu w stosunku do epikatechiny, jaką obserwuje się prawie w całym zakresie pH. Jednakże, na podstawie wartości parametru BDE(N) nie można wyjaśnić wyższej aktywności przeciwutleniającej TEAC galusanu epigalokatechiny w porównaniu do epigalokatechiny oraz galusanu galokatechiny w porównaniu do galokatechiny. Epigalokatechina, charakteryzująca się niższą niż jej galusan aktywnością TEAC, wykazuje względnie niską wartość BDE(N). Natomiast wartości BDE(N) wyznaczone dla galokatechiny i galusanu galokatechiny są zbliżone, co również nie tłumaczy istniejących różnic w aktywnościach TEAC tych związków w ich formach neutralnych.

Dlatego można wnioskować, że podwyższenie aktywności przeciwutleniającej TEAC katechin w wyniku przyłączenia do cząsteczek reszty kwasu galusowego nie wynika z wpływu tego ugrupowania na parametry molekularne katechin charakteryzujące ich zdolność do oddawania atomu wodoru. Efekt ten jest spowodowany wprowadzeniem do cząsteczki niezależnego ugrupowania, które samo może działać jako przeciwutleniacz, w wyniku czego całkowita aktywność przeciwutleniająca galusanów katechin równa się sumie aktywności macierzystej katechiny i wprowadzonej reszty kwasu galusowego (rysunek 17). Działanie reszty kwasu galusowego jako niezależnego elementu aktywności przeciwutleniającej potwierdza dodatkowo wartość BDE galusanu metylu, która jest tego samego rzędu co wartości BDE galusanów katechin.

Na podstawie porównania wartości TEAC katechin z obliczonymi parametrami charakteryzującymi zdolność do oddawania atomu wodoru lub elektronu można stwierdzić, że ani w oparciu o BDE ani w oparciu o IP nie można wyjaśnić różnic w wartościach TEAC pomiędzy poszczególnymi katechinami w ich formach neutralnych.

Dla wyjaśnienia przyczyny wzrostu aktywności przeciwutleniającej TEAC katechin wraz ze wzrostem pH, czyli po deprotonacji najłatwiej dysocjujących grup hydroksylowych, porównano wartości BDE i IP form neutralnych katechin z odpowiednimi wartościami obliczonymi dla ich form zdeprotonowanych (monoanionowych) (tabela 15). Po deprotonacji

katechiny mogą nadal działać przeciwutleniająco poprzez mechanizm oddawania atomu wodoru lub/i elektronu.

Porównując wartości BDE dla form zdeprotonowanych (BDE(A)) z wartościami BDE dla form neutralnych (BDE(N)) stwierdzono, że energie dysocjacji wiązania O-H nie ulegają obniżeniu po deprotonacji katechin, co oznacza, że na podstawie wartości BDE nie można wytłumaczyć przyczyny wzrostu aktywności przeciwutleniającej TEAC katechin po ich deprotonacji. Można więc wnioskować, że oddawanie atomu wodoru nie jest głównym mechanizmem działania katechin po deprotonacji. Stwierdzono natomiast, że parametr odzwierciedlający łatwość oddawania elektronu (IP) jest znacznie niższy dla form monoanionowych (A) katechin niż dla form neutralnych (N). Dlatego obserwowany wzrost aktywności przeciwutleniającej TEAC katechin ze wzrostem pH środowiska można wyjaśnić zwiększoną zdolnością katechin do oddawania elektronu, a nie atomu wodoru, po deprotonacji.

Przedstawione w pracy wyniki dotyczące wpływu pH na aktywność przeciwutleniającą TEAC katechin są zgodne z badaniami Mukai i współpracowników [2005] nad zdolnością katechin do regeneracji tokoferolu w roztworach o pH w zakresie 4 – 12. Stwierdzony wzrost stałych szybkości reakcji katechin z rodnikami tokoferylowymi wraz ze wzrostem wartości pH jest według autorów spowodowany wzrostem anionowego charakteru cząsteczek, czyli zdolnością katechin do oddawania elektronu [Mukai et al. 2005]. Zależny od pH wzrost aktywności przeciwutleniającej TEAC katechin, przedstawiony w niniejszej pracy, potwierdzają również wyniki badań Janeiro i Brett [2004] nad elektrochemicznym utlenianiem katechiny. Autorzy wykazali, że potencjał utleniania katechiny, wyznaczony za pomocą cyklicznej voltamperometrii, zależy w znacznym stopniu od pH środowiska. Wraz ze wzrostem pH wartość potencjału utleniania maleje, czyli rośnie zdolność katechiny do oddawania elektronu [Janeiro & Brett 2004].

Ponadto, w oparciu o literaturowe, teoretycznie obliczone parametry molekularne wyjaśniono niższą aktywność przeciwutleniającą galusanu galokatechiny w porównaniu do jego epimeru galusanu epigalokatechiny wraz ze wzrostem pH środowiska (rozdział 11.1., rysunek 15 c). W celu wyjaśnienia zaobserwowanych różnic w aktywnościach TEAC tych związków porównano odpowiednie literaturowe, teoretycznie obliczone wartości BDE i IP form obojętnych i monoanionowych tych galusanów z ich wartościami TEAC (tabela 15, rysunek 15 c). Na podstawie wartości parametru BDE(N) można stwierdzić, że zdolność galusanu galokatechiny do oddawania atomu wodoru jest nieznacznie niższa w porównaniu do jego epimeru galusanu epigalokatechiny, co znajduje odzwierciedlenie w zbliżonych

wartościach TEAC form obojętnych tych związków (w zakresie pH 2,0 – 3,5). Analogicznie, brak istotnych różnic pomiędzy wartościami TEAC omawianych galusanów w zakresie pH 2,0 – 3,5, znajdują odzwierciedlenie w wartościach IP(N). Jak wcześniej wykazano, wzrost aktywności przeciwutleniającej badanych katechin po deprotonacji wynika z większej zdolności form zdeprotonowanych związków do oddawania elektronu. Dlatego, do dalszej analizy wartości TEAC galusanów galokatechiny i epigalokatechiny w pH powyżej pKa posłużono się wartościami IP form monoanionowych związków. Porównując wartości IP(A) galusanu galokatechiny i galusanu epigalokatechiny można zauważyć, że różnica pomiędzy wartościami IP(A) tych związków jest znacznie większa niż różnica wartości IP ich form obojętnych. Po deprotonacji galusan galokatechiny jest wyraźnie gorszym donorem elektronu niż galusan epigalokatechiny, co tłumaczy niższą, wraz ze wzrostem pH środowiska, aktywność przeciwutleniającą galusanu galokatechiny w porównaniu do galusanu epigalokatechiny.

Również, na podstawie obliczonych teoretycznie wartości BDE, charakteryzujących zdolność cząsteczki do oddawania atomu wodoru, podjęto próbę wyjaśnienia obniżonej aktywności przeciwutleniającej katechin zawierających grupę karbonylową (galusanów katechin) w kwaśnym środowisku. Jak stwierdzono w rozdziale 11.1., znaczne obniżenie wartości TEAC galusanu epikatechiny i galusanu epigalokatechiny przy niskich wartościach pH (3,5 – 2,0) może być wynikiem protonacji grupy karbonylowej. Z teoretycznych obliczeń wynika, że tlen grupy karbonylowej jest najbardziej nukleofilowym miejscem cząsteczki każdego z analizowanych galusanów. Sprotonowana cząsteczka związku charakteryzuje się mniejszą zdolnością do oddawania atomu wodoru niż forma neutralna cząsteczki, co wykazano na podstawie literaturowych wartości BDE. Wartości BDE formy protonowej galusanu epigalokatechiny są wyższe o 4,5 kcal/mol dla grupy C4'-OH i o 6,5 kcal/mol dla grupy C4''-OH niż odpowiednie wartości BDE formy neutralnej. W przypadku galusanu epikatechiny wzrost wartości BDE grupy C3'-OH w wyniku protonacji wynosi 5,5 kcal/mol. Literaturowe, teoretycznie obliczone wartości parametru BDE po protonacji cząsteczki galusanu epikatechiny i galusanu epigalokatechiny stanowią wyjaśnienie zaobserwowanego spadku właściwości przeciwutleniających TEAC tych związków przy niskich wartościach pH (z zakresu od 3,5 do 2,0).

Podsumowując przedstawione wyniki badań można stwierdzić, że przyczyną wzrostu aktywności przeciwutleniającej TEAC katechin wraz ze wzrostem pH środowiska po deprotonacji najbardziej kwasowych grup hydroksylowych jest większa zdolność tych

związków do oddawania elektronu, czego odzwierciedleniem są niższe wartości IP form monoanionowych w porównaniu do form neutralnych katechin.

12. Właściwości protleniające katechin

Szereg właściwości pro-zdrowotnych katechin, takich jak właściwości przeciwmutagenne i przeciwnowotworowe, przypisuje się wysokiej aktywności przeciwutleniającej tych związków [Cooper et al. 2005a, b, Lambert & Yang 2003]. Na podstawie wyników badań ostatnich kilkunastu lat można jednak sądzić, że działanie przeciwnowotworowe katechin wynika z ich właściwości protleniających [Cooper et al. 2005b, Galati & O'Brien 2004, Lambert & Yang 2003].

Szczególnie istotna dla profilaktyki nowotworów jest indukcja ekspresji genów kodujących enzymy II fazy biotransformacji (enzymy detoksykacyjne). Selektywna indukcja ekspresji tych genów może stanowić skuteczną ochronę komórek przed toksycznym działaniem karcenogenów, jak i reaktywnych form tlenu (RFT) [Krajka-Kuźniak 2007]. Wiele związków naturalnie występujących w żywności może pełnić rolę induktorów ekspresji genów kodujących enzymy II fazy. Zalicza się do nich np. indolo-3-karbinol, iberynę, izotiocyjaniany i związki fenolowe [Chen & Kong 2004, Krajka-Kuźniak 2007, Śmiechowska et al. 2008]. Najnowsze wyniki badań wskazują na istotną rolę katechin zielonej herbaty jako induktorów ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne [Chou et al. 2000, Yang et al. 2006]. Jednakże mechanizm aktywacji ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne przez katechiny nie jest dokładnie znany.

Indukcja ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne zachodzi za pośrednictwem elementu kontrolującego EpRE (ang. *Electrophile-Responsive Element*), znanego wcześniej jako ARE (ang. *Antioxidant-Responsive Element*), występującego w regionach promotorowych genów kodujących enzymy detoksykacyjne [Boerboom et al. 2006]. Ponadto w regulacji ekspresji tych genów biorą udział dwa czynniki białkowe: czynnik transkrypcyjny Nrf2, wiążący się z EpRE oraz białko represorowe Keap1. W neutralnych warunkach aktywność Nrf2 jest blokowana przez białko represorowe Keap1, wiążące Nrf2. Decydującym etapem aktywacji ekspresji genów, zawierających EpRE, jest uwolnienie Nrf2 z kompleksu z Keap1. Jednym z proponowanych mechanizmów dysocjacji Nrf2 z kompleksu z Keap1 jest bezpośredni reakcja elektrofilowego induktora z białkiem Keap1, powodująca powstawanie mostka disiarczkowego w Keap1 (Cy273-Cy288), co w konsekwencji prowadzi

do zmian konformacji białka represorowego (Keap1). Katechiny nie mają charakteru elektrofilowego (raczej znane są jako antyoksydanty zdolne do oddawania elektronu), jednakże ich metabolity o strukturze chinonów mają charakter elektrofilowy potrzebny do indukcji ekspresji genu zawierającego w regionie promotorowym element EpRE.

Spośród wielu genów zawierających sekwencję EpRE na szczególną uwagę zasługuje gen kodujący oksydoreduktazę NAD(P)H: chinon 1 (NQO1). Indukcja ekspresji tego genu prowadzi do skutecznej ochrony komórki przed toksycznym działaniem metabolitów oraz RFT.

NQO1 jest ważnym enzymem biorącym udział w detoksykacji ksenobiotyków. Enzym ten, zlokalizowany głównie w cytoplazmie komórek, redukuje endogenne i egzogenne chinony w dwuelektronowej reakcji do bardziej stabilnych hydrochinonów, które mogą być bezpośrednio wydalane z organizmu lub ulegać dalszej biotransformacji w reakcjach sprzężania z kwasem glukuronowym lub siarkowym. W odróżnieniu od innych reduktaz chinonowych: reduktazy NADH:cytochrom c czy oksydoreduktazy ksantynowej, które katalizują jedynie jednoelektronowe redukcje chinonów, enzym NQO1 katalizuje wyłącznie reakcje dwuelektronowe [Krajka-Kuźniak 2007].

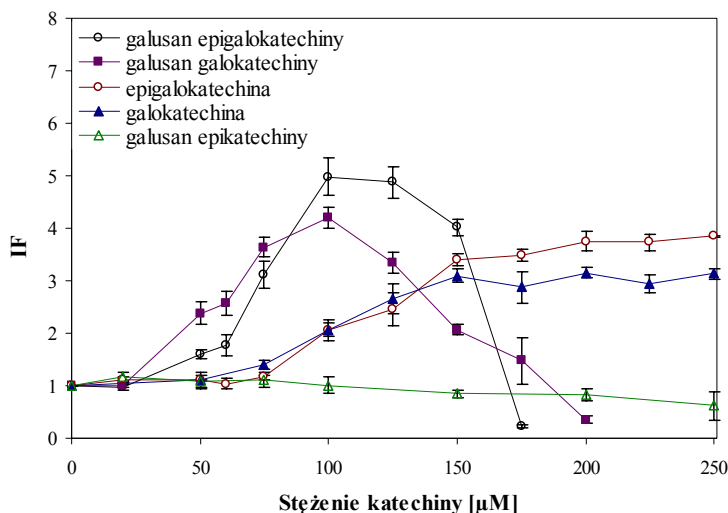
Wykazanie indukcji ekspresji genu kodującego oksydoreduktazę NAD(P)H: chinon 1 (NQO1) w komórkach eksponowanych na katechiny oraz identyfikacja elektrofilowych chinonów katechin, powstających w badanym systemie *in vitro*, potwierdziłyby rolę właściwości proutleniających katechin w indukcji ekspresji genu NQO1.

12.1. Indukcja ekspresji genu kodującego oksydoreduktazę NAD(P)H:chinon 1 (NQO1) przez katechiny

W pierwszym etapie badań określono poziom indukcji ekspresji genu kodującego oksydoreduktazę NAD(P)H:chinon 1 (NQO1) w komórkach EpRE-Lux eksponowanych na katechiny występujące w herbacie zielonej. W badaniach wykorzystano następujące katechiny: katechinę, epikatechinę, epigalokatechinę, galokatechinę, galusan epikatechiny, galusan epigalokatechiny i galusan galokatechiny.

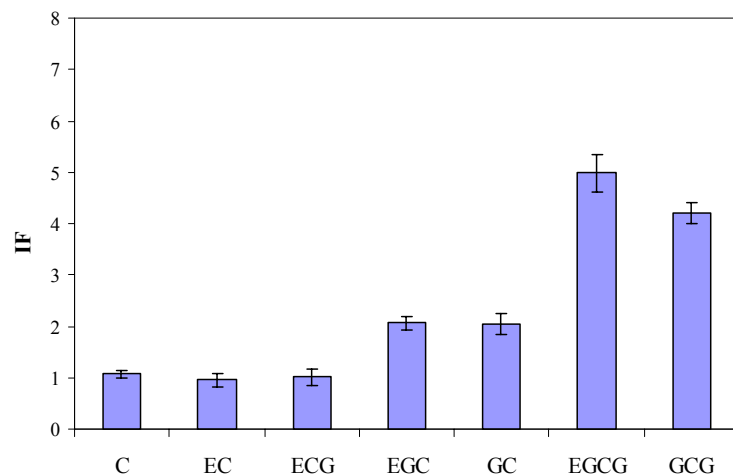
Na podstawie wyników przeprowadzonych badań (rysunki 18 i 19) stwierdzono, że spośród badanych katechin tylko epigalokatechina, galokatechina i ich galusany włączają transkrypcję genu kodującego NQO1. Poziom indukcji ekspresji tego genu w znacznym stopniu zależy od stężenia katechin. Wartość współczynnika indukcji rośnie wraz

ze wzrostem stężenia związku. Po osiągnięciu maksimum wartość współczynnika indukcji maleje na skutek toksycznego działania wysokich stężeń badanych katechin wobec komórek EpRE-Lux (rysunek 18). Katechina i epikatechina oraz galusan epikatechiny nie aktywują ekspresji genu kodującego NQO1 w całym badanym zakresie stężeń. Współczynniki indukcji tych związków niezależnie od stężenia wynoszą 1,0.



Rysunek 18. Poziom indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 przez katechiny. Wartość współczynnika indukcji (IF – *ang.* Induction Factor) jest średnią z trzech niezależnych eksperymentów

Galusany epigalokatechiny i galokatechiny wykazują najwyższy poziom indukcji ekspresji genu kodującego NQO1. Maksymalne wartości współczynników indukcji wynoszą 5,0 dla galusanu epigalokatechiny oraz 4,2 dla galusanu galokatechiny. Maksimum indukcji obserwuje się przy stężeniu 100 µM dla obu galusanów (rysunek 18 i 19). Aktywność epigalokatechiny i galokatechiny jako induktorów ekspresji genu NQO1 przy stężeniu 100 µM jest ponad dwukrotnie niższa niż aktywność ich odpowiednich galusanów (rysunek 19). Wyznaczone dla tej wartości stężenia współczynniki indukcji obu katechin wynoszą 2,0. Epigalokatechina maksymalną indukcję, wykazuje w zakresie stężeń 200 µM – 250 µM, podczas gdy jej epimer: galokatechina w zakresie stężeń 150 µM – 250 µM. Współczynniki indukcji wynoszą: 3,8 dla epigalokatechiny i 3,2 dla galokatechiny.



Rysunek 19. Poziom indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 przez 100 μ M roztwór: C – katechiny, EC – epikatechiny, ECG – galusanu epikatechiny, EGC – epigalokatechiny, GC – galokatechiny, EGCG – galusanu epigalokatechiny i GCG – galusanu galokatechiny. Wartość współczynnika indukcji (IF) jest średnią z trzech niezależnych eksperymentów

Analiza wyników uzyskanych w toku badań doprowadziła do wniosku, że zdolność do indukcji wykazują jedynie epigalokatechina, galokatechina i ich galusany posiadające ugrupowanie pyrogalolowe. Katechina i epikatechina posiadające układ katecholowy w pierścieniu B oraz galusan epikatechiny posiadający w cząsteczce ugrupowanie katecholowe i resztę kwasu galusowego nie aktywują na poziomie transkrypcji genu kodującego NQO1.

W tabeli 16 przedstawiono maksymalne wartości współczynników indukcji badanych katechin. Dodatkowe oznaczenia w tej tabeli wskazują, które spośród badanych katechin zawierają ugrupowanie pyrogalolowe i/lub resztę kwasu galusowego.

Na podstawie wyników zawartych w tabeli 16 można stwierdzić, że najbardziej skutecznym induktorem ekspresji genu NQO1, wśród katechin występujących w herbacie zielonej, jest galusan epigalokatechiny (IF = 5,0 dla 100 μ M związku). W celu weryfikacji otrzymanych wyników wartość współczynnika indukcji 100 μ M galusanu epigalokatechiny porównano z literaturowymi danymi (wyznaczonymi metodą RT-PCR) charakteryzującymi poziom mRNA genu kodującego NQO1 w komórkach EpRE-Lux eksponowanych na 100 μ M galusanu epigalokatechiny [Muzolf-Panek et al. 2008]. Wyniki badań ujawniły 5,3-krotny wzrost poziomu mRNA NQO1, co jednoznacznie wskazuje, że indukcji ekspresji genu lucyferazy w metodzie EpRE-LUX towarzyszy jednocześnie indukcja ekspresji genu NQO1.

Tabela 16. Maksymalne wartości współczynników indukcji (IF) badanych katechin, jak również wartości potencjałów utleniania ($E_{1/2}$) [Yang et al. 2001] oraz wartości różnicy ciepła tworzenia (DHF) [Muzolf-Panek et al. 2008]

Katechina	IF	$E_{1/2}$ [V]	DHF [kcal/mol]	Grupa pyrogalolowa	Reszta kwasu galusowego
1 Katechina	1,0	0,10	44,1	-	-
2 Epikatechina	1,0	0,08	44,2	-	-
3 Galusan epikatechiny	1,1	0,08	44,1	-	+
4 Epigalokatechina	3,8	-0,04	43,1	+	-
5 Galokatechina	3,2	-0,03	43,3	+	-
6 Galusan epigalokatechiny	5,0	-0,02	43,3	+	+
7 Galusan galokatechiny	4,2	-0,01	43,7	+	+

Największą skuteczność galusanu epigalokatechiny jako induktora ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne wykazali również Chen i współpracownicy [2000]. Autorzy badali indukcję ekspresji genów kodujących enzymy II fazy biotransformacji przez katechiny w komórkach HepG2 (ludzkie komórki wątrobowe), poddanych stabilnej transfekcji genem reporterowym pARE-TI-lucyferaza (obecnie znanym jako EpRE-lucyferaza) [Chen et al. 2000]. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzili oni, że galusan epigalokatechiny oraz galusan epikatechiny są najsilniejszymi induktorami spośród badanych katechin. Epigalokatechina oraz epikatechina charakteryzowały się ponad czterokrotnie niższym współczynnikiem indukcji w porównaniu do ich galusanów. Katechina natomiast nie indukowała ekspresji genów zawierających w rejonie promotorowym element EpRE. Ponieważ wysoki poziom indukcji ekspresji genu reporterowego ARE-lucyferaza wykazały jedynie katechiny zawierające resztę kwasu galusowego, Chen i współpracownicy [2000] wysunęli wniosek, że zdolność katechin do indukcji jest wynikiem obecności reszty kwasu galusowego w ich cząsteczkach. Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy (rysunek 18, tabela 16) nie potwierdzają jednak tego wniosku, ponieważ galusan epikatechiny nie indukuje ekspresji genu kodującego NQO1. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zdolność do indukcji wykazują jedynie katechiny posiadające ugrupowanie pyrogalolowe w cząsteczce (tabela 16).

Na podstawie otrzymanych wyników można ponadto stwierdzić, że stężenia katechin, przy których związki te są zdolne do indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 są stosunkowo wysokie i zawierają się w przedziale 25 μM – 250 μM . Maksymalne stężenie katechin oraz ich metabolitów w osoczu krwi może sięgać zaledwie kilku mikromoli [Feng 2006]. Nasuwa się więc pytanie: czy aktywacja na poziomie transkrypcji genu kodującego NQO1 przez katechiny będzie miała miejsce w organizmie? Wyniki badań Yang i współpracowników [1999] wskazują, że poziom epigalokatechiny w ślinie po wypiciu 2 lub 3 filiżanek herbaty zielonej może osiągnąć wartość 44 $\mu\text{g/ml}$ (144 μM). Zatem istnieje możliwość, że stężenie katechin w przewodzie pokarmowym osiągnie poziom, przy którym obserwuje się indukcję ekspresji genu NQO1.

12.2. Rola właściwości proutleniających katechin w mechanizmie indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 za pośrednictwem EpRE

Na podstawie wyników przedstawionych w poprzednim rozdziale stwierdzono, że katechiny mogą indukować ekspresję genu kodującego NQO1 zawierającego w rejonie promotorowym element EpRE. Katechiny nie mają jednak charakteru elektrofilowego, który jest kluczowy dla mechanizmu indukcji; raczej znane są jako antyoksydanty zdolne do oddawania elektronu. Charakter elektrofilowy, konieczny do aktywacji transkrypcyjnej genu zawierającego w regionie promotorowym sekwencję EpRE, posiadają natomiast metabolity katechin o strukturze chinonów, które powstają na skutek utleniania (chemicznego lub enzymatycznego) katechin. Dotychczas powstawanie chinonów katechin uznawano za niekorzystne dla ludzkiego organizmu.

12.2.1. Indukcja ekspresji genu kodującego NQO1 przez katechiny w komórkach z modyfikowanym poziomem glutationu

W celu wykazania, że indukcja ekspresji genu kodującego NQO1 przez katechiny jest wynikiem ich aktywności proutleniającej, czyli zdolności do tworzenia chinonów, zbadano zdolność katechin do indukcji ekspresji tego genu w komórkach EpRE-Lux z normalnym, podwyższonym i obniżonym poziomem wewnątrzkomórkowego glutationu (GSH). GSH jest endogennym przeciwutleniaczem niskocząsteczkowym, odpowiedzialnym za utrzymanie równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w komórce poprzez reakcje z wolnymi

rodnikami i/lub chinonami [Bartosz 2003]. Im wyższy poziom wewnątrzkomórkowego GSH tym większa ilość związków elektrofilowych ulega sprzężeniu z glutationem. Zmniejszenie poziomu GSH powoduje zachwianie homeostazy i sprawia, że komórki stają się bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny. Przy założeniu, że katechiny aktywują transkrypcyjnie gen NQO1 w wyniku oddziaływań elektrofilowych chinonów (lub RFT jako produktów reakcji tych chinonów w cyklu redoks) z białkiem represorowym Keap1, wzrost poziomu GSH w komórce powinien skutkować obniżeniem współczynnika indukcji katechin. Analogicznie, obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu GSH powinno skutkować wzrostem współczynnika indukcji.

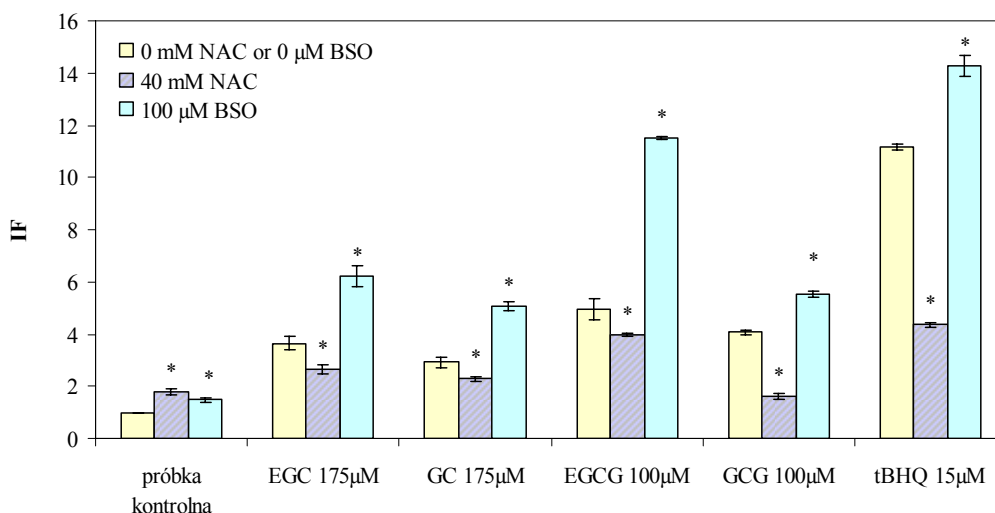
Podwyższenie poziomu wewnątrzkomórkowego GSH otrzymano w wyniku pre-inkubacji komórek EpRE-Lux z *N*-acetylo-L-cysteiną (NAC) – prekursorem glutationu zdolnym do generowania dużych ilości komórkowego glutationu. Obniżenie poziomu GSH w komórkach EpRE-Lux wywołano poprzez pre-inkubację komórek z DL-butionino-[S,R]-sulfoksyminą (BSO) – inhibitorem kluczowego enzymu biosyntezy glutationu: syntetazy (γ -glutamylcysteinowej). Tak przygotowane komórki eksponowano na katechiny zdolne do indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 (epigalokatechinę, galokatechinę i ich galusany). Stężenia poszczególnych katechin były tak dobrane by związek wykazywał wysoki współczynnik indukcji przy jednoczesnym braku efektu toksycznego. Dla porównania w badaniach wykorzystano również *tert*-butylohydrochinon (tBHQ), który jest typowym induktorem ekspresji genów zawierających w rejonie promotorowym element EpRE.

Na rysunku 20 przedstawiono wartości współczynników indukcji poszczególnych katechin oraz tBHQ w komórkach z normalnym (niezmienionym), podwyższonym i obniżonym poziomem GSH.

Na podstawie analizy danych zamieszczonych na rysunku 20 można stwierdzić, że w wyniku podwyższenia poziomu wewnątrzkomórkowego GSH następuje znaczne obniżenie poziomu indukcji ekspresji genu NQO1 przez katechiny. Współczynnik indukcji wyznaczony dla epigalokatechiny uległ obniżeniu z 3,6 do 2,6 natomiast dla galokatechiny z 2,9 do 2,3. Wartość współczynnika indukcji wyznaczona dla galusanu epigalokatechiny uległa obniżeniu o około jednostkę z 4,9 do 4,0. W przypadku galusanu galokatechiny obserwowany spadek poziomu indukcji ekspresji genu NQO1 był największy spośród badanych katechin. Współczynnik indukcji galusanu galokatechiny uległ obniżeniu z 4,0 do 1,6.

Również w oparciu o wyniki badań (rysunek 20) wykazano, że na skutek obniżenia poziomu GSH w komórkach EpRE-Lux następuje znaczny wzrost poziomu indukcji ekspresji

genu NQO1 przez katechiny. Wartość współczynnika indukcji wyznaczona dla epigalokatechiny wzrosła z 3,6 do 6,2, a dla galokatechiny z 2,9 do 5,1. Wzrost poziomu indukcji ekspresji genu NQO1 w komórkach eksponowanych na galusan epigalokatechiny i BSO jest największy i wynosi 5,5 jednostki z IF = 4,9 do IF = 11,5. Wartość współczynnika indukcji galusanu galokatechiny wzrosła o 1,5 jednostki z 4,0 do 5,5.



Rysunek 20. Poziom indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 przez katechiny oraz *tert*-butylohydrochinon (tBHQ), jak również próbkę kontrolną (0,5% DMSO) w komórkach EpRE-Lux z niezmienionym (0 mM NAC i 0 μM BSO), podwyższonym (40 mM NAC) lub obniżonym (100 μM BSO) poziomem glutationu. Wartość współczynnika indukcji (IF) jest średnią z trzech niezależnych eksperymentów. * wskazuje na istotną różnicę w porównaniu do próbki o niezmienionym poziomie glutationu (test t-Studenta, $p < 0,05$). Badane katechiny oznaczono następującymi skrótami: C – katechina, EC – epikatechina, ECG – galusan epikatechiny, EGC – epigalokatechina, GC – galokatechina, EGCG – galusan epigalokatechiny i GCG – galusan galokatechiny.

Poprawność otrzymanych dla poszczególnych katechin wyników zweryfikowano przez porównanie wyznaczonych doświadczalnie współczynników indukcji dla tBHQ z danymi literaturowymi [Lee-Hilz et al. 2006]. Na podstawie uzyskanych wyników (rysunek 20) stwierdzono, że aktywność tBHQ w komórkach zawierających podwyższony poziom GSH jest mniejsza niż w komórkach z normalnym poziomem tego endogenego przeciwutleniacza. Współczynnik indukcji wyznaczony dla tBHQ uległ obniżeniu z 11,2 do 4,3. Ponadto stwierdzono, że zahamowanie syntezy GSH w komórkach skutkuje podwyższeniem poziomu indukcji ekspresji genu NQO1 przez tBHQ. Współczynnik indukcji tBHQ wzrósł z 11,2 do 14,3. Literaturowe wartości współczynników indukcji tBHQ

w komórkach z normalnym, obniżonym lub podwyższonym poziomem GSH są zgodne z wynikami uzyskanymi w toku niniejszych badań.

Na podstawie analizy otrzymanych wyników stwierdzono również, że inkubacja komórek tylko z BSO (próbka kontrolna) powoduje 1,4-krotną indukcję ekspresji genu kodującego NQO1 (rysunek 20). Jednakże wartość sumy współczynników indukcji BSO i poszczególnych katechin w komórkach z niezmiennym poziomem GSH jest zawsze niższa niż wartość współczynników indukcji poszczególnych katechin w komórkach z obniżonym poziomem GSH. Tak więc wyższy poziom indukcji ekspresji genu NQO1 przez katechiny w komórkach z niedoborem GSH nie jest wynikiem efektu addytywnego indukcji ekspresji tego genu przez BSO i poszczególne katechiny.

Zaobserwowane zmiany wartości współczynników indukcji katechin w komórkach EpRE-Lux z obniżonym lub podwyższonym poziomem GSH wskazują na istotną rolę chinonów katechin, powstających w wyniku ich działania proutleniającego, w mechanizmie indukcji ekspresji genu kodującego NQO1.

12.2.2. Zależności pomiędzy parametrami charakteryzującymi łatwość utleniania katechin a ich zdolnością do indukcji NQO1

Dodatkowym potwierdzeniem roli właściwości proutleniających katechin w mechanizmie indukcji ekspresji genu kodującego enzym detoksykacyjny – NQO1 są zależności pomiędzy parametrami charakteryzującymi łatwość utleniania katechin a wyznaczonymi doświadczalnie dla tych związków współczynnikami indukcji. W tabeli 16 (rozdział 12.1.) przedstawiono literaturowe wartości potencjałów utleniania ($E_{1/2}$) oraz literaturowe, teoretycznie obliczone wartości różnicy ciepła tworzenia (DHF – ang. *Difference in Heat of Formation*). Potencjał utleniania odzwierciedla zdolność związku do oddawania elektronów. Im niższa wartość $E_{1/2}$ tym łatwiej związek ulega utlenieniu. Różnica ciepła tworzenia (DHF) jest definiowana jako różnica pomiędzy ciepłem tworzenia obliczonym dla teoretycznie najbardziej stabilnej konformacji chinonu katechiny a ciepłem tworzenia obliczonym dla zredukowanej formy tej katechiny i wyraża energię potrzebną do utworzenia chinonu. Im niższa wartość DHF tym łatwiej związek ulega utlenieniu i łatwiej tworzy odpowiedni chinon.

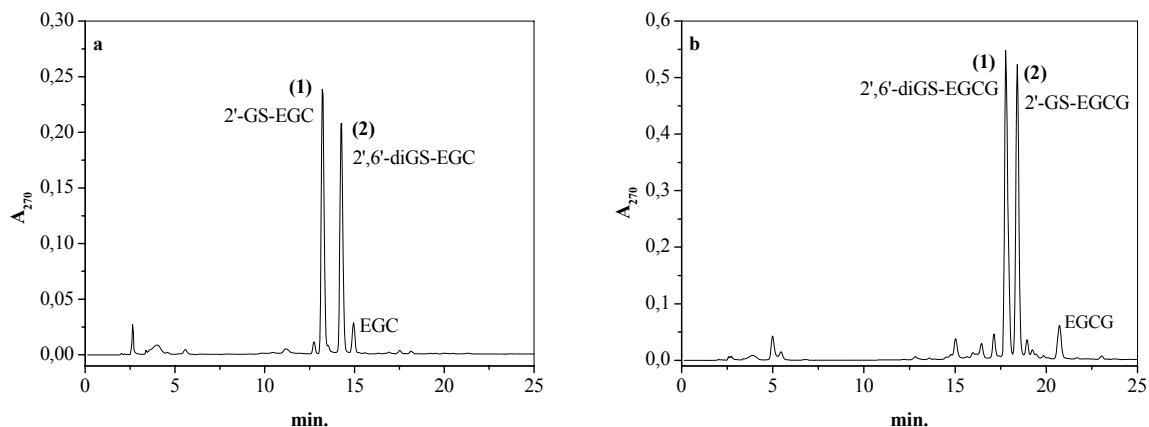
Z porównania wartości parametrów $E_{1/2}$ i DHF z wyznaczonymi doświadczalnie współczynnikami indukcji katechin wynika, że katechiny (posiadające ugrupowanie

pyrogalolowe) będące dobrymi induktorami ekspresji genu NQO1 (epigalokatechina, galokatechina oraz ich galusany) charakteryzują się niskimi wartościami $E_{1/2}$ oraz DHF. Natomiast katechiny bez ugrupowania pyrogalolowego, które nie mają zdolności do indukcji ekspresji genu NQO1: katechina, epikatechina oraz galusan epikatechiny wykazują wysokie wartości $E_{1/2}$, jak i DHF. Zatem zdolność katechin do indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 wynika z łatwości utleniania katechin, czyli ich zdolności do tworzenia chinonów. Uzyskane wyniki wskazują, że za indukcję ekspresji genu NQO1 są odpowiedzialne chinony katechin i potwierdzają rolę aktywności proutleniającej katechin w tej indukcji.

12.2.3. Zdolność katechin do tworzenia chinonów *in vitro*

Zdolność najbardziej aktywnych katechin (epigalokatechiny oraz galusanu epigalokatechiny) do tworzenia chinonów wykazano przeprowadzając reakcje ich utleniania w obecności tyrozynazy i glutationu *in vitro*. Ponieważ wysoka reaktywność chinonów uniemożliwia ich bezpośrednią identyfikację, chinony katechin wykryto drogą pośrednią poprzez identyfikację koniugatów, które chinony katechin tworzą z glutationem. Utworzone w reakcji utleniania katechin w obecności glutationu koniugaty katechin z glutationem rozdzielono i wstępnie zidentyfikowano metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC).

Na rysunku 21 przedstawiono chromatogramy HPLC mieszaniny inkubacyjnej epigalokatechiny i galusanu epigalokatechiny z GSH w obecności tyrozynazy. Stwierdzono, że w wyniku inkubacji epigalokatechiny z glutationem w obecności tyrozynazy powstają dwa produkty o czasach retencji 13,2 min. i 14,2 min. (rysunek 21 a). Produktów tych nie wykryto w mieszaninie inkubacyjnej zawierającej tylko epigalokatechinę i glutation lub tylko tyrozynazę. Czas retencji epigalokatechiny wynosi 14,9 min. Inkubacja galusanu epigalokatechiny z glutationem w obecności tyrozynazy prowadzi również do powstania dwóch produktów o czasach retencji 17,8 min. i 18,4 min. (rysunek 21 b). Oba produkty nie zostały wykryte w próbce kontrolnej (mieszanina inkubacyjna galusanu epigalokatechiny i glutationu lub tyrozynazy). Galusan epigalokatechiny charakteryzuje się czasem retencji 20,7 min.



Rysunek 21. Chromatogramy HPLC mieszaniny inkubacyjnej a) epigalokatechiny (EGC) oraz b) galusanu epigalokatechiny (EGCG) z glutationem w obecności tyrozynazy

Na podstawie chromatogramów HPLC oraz wyników analizy widm masowych LC/MS i protonowego rezonansu magnetycznego H^1 NMR [Muzolf-Panek et al. 2008, Sang et al. 2005b] stwierdzono, że powstałe w wyniku utleniania każdej z badanych katechin produkty są koniugatami chinonów katechin z glutationem. Wyniki analizy widm masowych LC/MS produktów wyizolowanych z mieszaniny inkubacyjnej epigalokatechiny z GSH i tyrozynazą wskazują na obecność w widmie mas piku $[M+1]$ przy m/z 613 dla pierwszego produktu tej mieszaniny. W przypadku produktów wyizolowanych z mieszaniny inkubacyjnej galusanu epigalokatechiny z glutationem i tyrozynazą stwierdzono, w widmie mas, obecność piku $[M+1]$ przy m/z 765 dla drugiego produktu tej mieszaniny. Wartości mas produktów inkubacji badanych katechin z GSH i tyrozynazą są identyczne z teoretycznie obliczonymi wartościami mas cząsteczkowych monoglutationylo-epigalokatechiny i monoglutationylo-galusanu epigalokatechiny. Identyfikacja pozostałych produktów inkubacji katechin z GSH i tyrozynazą metodą LC/MS była niemożliwa ze względu na ich nietrwałość w warunkach LC/MS.

Dokładna identyfikacja koniugatów chinonów katechin, na podstawie widm H^1 NMR, została przedstawiona w pracy, której autorka jest współautorem [Muzolf-Panek et al. 2008]. W oparciu o wartości przesunięć chemicznych oraz stałych sprzężeń uzyskanych metodą H^1 NMR stwierdzono, że otrzymane koniugaty chinonów katechin z glutationem to: 2'-glutationylo-epigalokatechyna (2'-GS-EGC), 2',6'-diglutationylo-epigalokatechyna (2',6'-diGS-EGC) oraz 2'-glutationylo-galusan epigalokatechiny (2'-GS-EGCG) i 2',6'-diglutationylo-galusan epigalokatechiny (2',6'-diGS-EGCG).

Przedstawione powyżej wyniki badań metodą *in vitro* wskazują, że obie aktywne biologicznie katechiny (epigalokatechina i galusan epigalokatechiny) są zdolne do tworzenia chinonów.

Powstawanie koniugatów chinonów katechin z glutationem wyłącznie w pierścieniu B cząsteczki danej katechiny potwierdza również szczególną rolę ugrupowania pyrogalolowego w działaniu proutleniającym katechin. Sang i współpracownicy [2005b] wykazali jednak, że chinony galusanu epigalokatechiny z glutationem powstają zarówno w pierścieniu B (2'-monoglutationylo-galusan epigalokatechiny), jak również w pierścieniu kwasu galusowego (2''-monoglutationylo-galusan epigalokatechiny). Powstawanie 2',6'-diglutationylo-galusanu epigalokatechiny zamiast 2''-glutationylo-galusanu epigalokatechiny (jak wykazali Sang i współpracownicy) może być spowodowane różnym odczynem pH buforów, w którym przeprowadzano inkubacje. Sang i współpracownicy [2005b] wykonali inkubację w buforze o pH 5,5, podczas gdy badania przedstawione w niniejszej pracy przeprowadzono w buforze o pH 7,0. Wpływ pH na regioselektywność reakcji koniugacji chinonów flawonoidów z glutationem wykazali wcześniej Awad i współpracownicy [2002b].

Podsumowując, na podstawie wyników przeprowadzonych badań nad właściwościami proutleniającymi katechin udowodniono, że w wyniku utleniania enzymatycznego katechin zachodzącego w komórkach powstają ich wysoce reaktywne metabolity o strukturze chinonów. Wykazano również, że katechiny, a ściślej ich chinony indukują ekspresję genu kodującego oksydoreduktazę NAD(P)H:chinon 1 (NQO1), który jest ważnym enzymem detoksykacyjnym. Ponadto w oparciu o wyniki badań nad rolą właściwości proutleniających katechin w indukcji ekspresji genu NQO1 wykazano, że ugrupowanie pyrogalolowe (3',4',5'-*triOH*) katechin ma kluczowe znaczenie dla indukcji ekspresji tego genu przez katechiny.

PODSUMOWANIE

Katechiny występują powszechnie w produktach pochodzenia roślinnego (herbata, wino, czekolada, owoce). Najbogatszym źródłem katechin jest herbata, w szczególności zielona. Szacuje się, że katechiny występujące w herbacie stanowią 83,5% flawonoidów spożywanych z codzienną dietą [Chun et al. 2007]. Ze względu na szerokie spektrum właściwości biologicznych katechiny odgrywają ważną rolę w ochronie organizmu przed chorobami cywilizacyjnymi, takimi jak np. nowotwory i choroby sercowo-naczyniowe oraz chorobami neurodegeneracyjnymi. Ponadto katechiny występujące w produktach żywnościowych, jako naturalne przeciwutleniacze, chronią składniki żywności przed niepożądanymi procesami utleniania, w wyniku których następuje obniżenie wartości odżywczej, a często nawet zdrowotnej oraz pogorszenie właściwości sensorycznych produktów.

W niniejszej pracy przedstawiono stan najnowszej wiedzy na temat pro-zdrowotnych właściwości herbaty zielonej oraz właściwości biologicznych występujących w niej katechin, ze szczególnym uwzględnieniem ich aktywności przeciw- i pro-utleniającej. W części doświadczalnej pracy przedstawiono wyniki badań własnych dotyczących czynników wpływających na aktywność przeciwutleniającą herbat zielonych różnych marek. Zaproponowano również wykorzystanie wartości TEAC, odzwierciedlającej aktywność przeciwutleniającą, jako parametru do oceny jakości dostępnych na rynku herbat zielonych liściastych oraz ich ekstraktów. Ponadto określono czynniki wpływające na aktywność przeciwutleniającą TEAC katechin występujących w herbatach zielonych, których wcześniej nie brano pod uwagę. Zbadano również zdolność katechin do indukcji ekspresji genu kodującego ważny enzymu detoksykacyjny - oksydoreduktazę NAD(P)H:chinon 1 oraz potwierdzono rolę właściwości protleniających katechin w mechanizmie tej indukcji.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań wykazano, że aktywność przeciwutleniająca TEAC wodnych ekstraktów z herbat zielonych różnych marek różni się znacząco i jest dodatnio skorelowana z całkowitą zawartością związków polifenolowych oraz ogólną zawartością katechin w badanych ekstraktach. Wysoki współczynnik korelacji dla zależności wartości TEAC ekstraktów od ogólnej zawartości związków polifenolowych ($R = 0,958$) wskazuje, że czynnikiem decydującym o ich aktywności przeciwutleniającej TEAC jest zawartość związków polifenolowych w herbatach zielonych. Zawartość związków polifenolowych w produktach uznaje się obecnie za wskaźnik ich jakości. W pracy wykazano, że z wyznaczonej zależności wartości TEAC wodnych ekstraktów z herbat zielonych

od całkowitej zawartości w nich związków polifenolowych (rysunek 11, str. 79) można z dużym przybliżeniem oszacować ogólną zawartość związków polifenolowych w herbatach zielonych różnych marek. Pozwala to na oszczędność nie tylko czasu analizy, ale również na zmniejszenie kosztów, które wiążą się z oznaczeniem zawartości polifenoli za pomocą metod takich jak HPLC. Ponieważ wartość TEAC zależy bezpośrednio od zawartości związków polifenolowych, parametr TEAC można zaproponować jako jeden z elementów oceny towaroznawczej herbat zielonych oraz jej ekstraktów. Miałoby to istotne znaczenie dla producentów żywności stosujących dodatek ekstraktów z herbat zielonych w celu zachowania wysokiej jakości żywności podczas jej przechowywania na półkach sklepowych. Ponadto parametr TEAC, umieszczany na etykiecie produktu, mógłby być istotną informacją dla konsumentów umożliwiającą im podjęcie decyzji odnośnie zakupu danej marki herbaty zielonej.

Aktywność przeciwutleniaczy oznacza się powszechnie przy wartości $\text{pH} = 7,4$. Jednak odczyn pH zmienia się w różnych narządach i tkankach w szerokim zakresie (od $\text{pH} 1,0$ w żołądku, przez $\text{pH} 5,3$ w jelicie cienkim, $\text{pH} 6,8$ śliny, $\text{pH} 7,4$ ludzkich tkanek i płynów ustrojowych, $\text{pH} 8$ w jelicie grubym, $\text{pH} 7 - 8,7$ w trzustce, do $\text{pH} 8,3 - 9,3$ w dwunastnicy [Grzymisławski 2000]) i wpływa w dużym stopniu na wchłanianie, rozmieszczenie i biotransformację związków bioaktywnych w organizmie. Zależność działania przeciwutleniającego katechin od pH środowiska może mieć istotne znaczenie dla ich reakcji w przewodzie pokarmowym. Również w żywności zmiany pH mogą powodować zmiany właściwości jej składników, w tym także przeciwutleniaczy dodawanych w procesach technologicznych.

W niniejszej pracy zbadano wpływ pH na aktywność przeciwutleniającą wodnych ekstraktów z herbat zielonych oraz katechin w nich występujących. Badania przeprowadzono za pomocą zmodyfikowanej metody TEAC, która jedyna spośród wielu znanych metod umożliwia oznaczenie aktywności przeciwutleniającej w szerokim zakresie pH (2,0 – 9,5).

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że aktywność przeciwutleniająca TEAC ekstraktów z herbat zielonych w znacznym stopniu zależy od pH środowiska (rysunek 12, str. 82). Wartości TEAC badanych ekstraktów (odzwierciedlające aktywność przeciwutleniającą) rosną wraz ze wzrostem pH . Efekt ten obserwowany jest w fizjologicznym zakresie pH , jak również w zakresie pH produktów, takich jak mięso czy masło, w których dodatek ekstraktu z herbaty zielonej może pełnić rolę naturalnego przeciwutleniacza. Na podstawie wyznaczonej zależności wartości TEAC danego ekstraktu

od pH można, znając odczyn pH produktu, wstępnie oszacować aktywność przeciwutleniającą ekstraktu w tym produkcie.

Na podstawie otrzymanych zależności aktywności przeciwutleniającej TEAC wybranych katechin od pH środowiska stwierdzono, po raz pierwszy, że czynnikiem decydującym o właściwościach przeciwutleniających katechin jest pH środowiska, w którym zachodzi wolnorodnikowy proces utleniania (rysunki 13 i 15, str. 85 i 88). Wykazano także, że wartości TEAC badanych katechin rosną wraz ze wzrostem pH. Stwierdzono również, że największą aktywność przeciwutleniającą TEAC, w prawie całym badanym zakresie pH, wykazują galusany epikatechiny, epigalokatechiny i galokatechiny. Stwierdzone zależności aktywności przeciwutleniającej katechin od pH pozwoliły na wysunięcie sugestii, że właściwości kwasowo-zasadowe (pKa) badanych związków mają wpływ na ich aktywność przeciwutleniającą TEAC w fizjologicznym zakresie pH.

W celu wyjaśnienia tego problemu, literaturowe oraz eksperymentalnie wyznaczone wartości pKa dla badanych katechin porównano z literaturowymi wartościami energii deprotonacji (DE). Wykazano, że pomiędzy wartościami pKa a DE istnieje istotna liniowa zależność o współczynniku korelacji $R = 0,975$ (rysunek 16, str. 92). Na podstawie równania tej zależności można obliczyć wartości pKa katechin oraz związków o podobnej strukturze, takich jak galusan metylu, dla których brak jest w literaturze danych. Z wyznaczonej zależności wynika, że struktura katechin (liczba grup hydroksylowych i miejsce podstawienia) wpływa na wartości pKa najłatwiej dysocjujących grup OH. Podobny efekt zaobserwowano wcześniej dla hydroksyflawonów i kwasów 4-hydroksybenzoesowych [Lemańska et al. 2003, Tyrakowska et al. 1999].

Na podstawie porównania wartości pKa katechin z ich wyznaczonymi profilami wartości TEAC od pH wykazano, że przyczyną wzrostu aktywności przeciwutleniającej TEAC katechin wraz ze wzrostem pH jest deprotonacja najbardziej kwasowych grup OH (C3'-OH, C4'-OH i/lub C4''-OH) w cząsteczce. W dotychczasowych badaniach katechin nie brano pod uwagę wpływu dysocjacji na ich aktywność przeciwutleniającą.

Z wartości pKa katechin wynika, że deprotonacja grup OH następuje w fizjologicznym zakresie pH. Oznacza to, że w roztworach o pH 7,4, w których oznaczano aktywność przeciwutleniającą TEAC katechin, związki te występują jako mieszanina form cząsteczkowych w różnych stosunkach molowych. Otrzymane w toku niniejszych badań zależności aktywności przeciwutleniającej TEAC katechin od pH oraz wartości pKa katechin umożliwiły wyznaczenie aktywności przeciwutleniającej TEAC dla poszczególnych katechin w ściśle określonym stanie protonacji np. formie obojętnej lub monoanionowej.

Zależność między strukturą związków polifenolowych a ich aktywnością przeciwutleniającą od lat jest przedmiotem badań wielu naukowców. Z opublikowanych dotychczas w literaturze danych wynika, że aktywność przeciwutleniająca związków polifenolowych zależy w dużej mierze od liczby grup hydroksylowych [Salah et al. 1995, Rice-Evans et al. 1996]. Wyniki badań uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają wpływ liczby grup OH na aktywność przeciwutleniającą TEAC katechin. Jednak na podstawie analizy zależności wartości TEAC katechin od pH środowiska, wykazano, że poza liczbą grup OH istotne jest również ich rozmieszczenie w cząsteczce. Stwierdzono, że przede wszystkim reszta kwasu galusowego oraz w mniejszym stopniu grupa pyrogalolowa odpowiadają za wysoką aktywność TEAC katechin. Stwierdzono również, że reszta kwasu galusowego jest odpowiedzialna za wzrost aktywności katechin w zakresie pH powyżej 3,5.

Ponadto, na podstawie porównania eksperymentalnie wyznaczonych zależności wartości TEAC galusanu epigalokatechiny oraz galusanu epikatechiny od pH z zależnościami wyznaczonymi teoretycznie dla tych związków przez zsumowanie wartości TEAC epigalokatechiny i galusanu metylu lub epikatechiny i galusanu metylu przy odpowiednich pH (rysunek 17, str. 94) wykazano istnienie addytywnego efektu dwóch niezależnych, aktywnych przeciwrodnikowo ugrupowań pyrogalolowego i reszty kwasu galusowego w galusanie epigalokatechiny oraz katecholowego i reszty kwasu galusowego w galusanie epikatechiny. W oparciu o efekt addytywny dwóch niezależnych ugrupowań występujących zarówno w galusanie epigalokatechiny, jak i w galusanie epikatechiny wyjaśniono przyczynę znacznie większej aktywności przeciwutleniającej tych związków w porównaniu do aktywności epigalokatechiny i epikatechiny w zakresie pH powyżej 3,5. Z opublikowanych w literaturze danych wiadomo, że ugrupowanie pyrogalolowe w pierścieniu B i reszta kwasu galusowego w pozycji C3 katechiny stanowią ważne elementy dla aktywności przeciwrodnikowej katechin w teście DPPH [Nanjo et al. 1996]. Dotychczas nie wyjaśniono jednak znaczenia tych elementów.

W oparciu o addytywny efekt przeciwutleniający dwóch niezależnych ugrupowań występujących zarówno w galusanie epigalokatechiny, jak i w galusanie epikatechiny jednoznacznie wyjaśniono dlaczego ugrupowania pyrogalolowe i katecholowe oraz reszta kwasu galusowego mają kluczowe znaczenie dla aktywności przeciwutleniającej katechin.

W celu wyjaśnienia wpływu dodatkowych grup hydroksylowych oraz przyczyny wzrostu aktywności przeciwutleniającej TEAC katechin po deprotonacji ich najbardziej kwasowych grup OH eksperymentalne wartości TEAC katechin, w zdefiniowanym stanie protonacji, porównano z literaturowymi, obliczonymi teoretycznie wartościami energii

dysocjacji wiązania O-H (BDE) charakteryzującymi zdolność cząsteczki do oddawania atomu wodoru oraz z wartościami potencjałów jonizacji (IP) odzwierciedlającymi zdolność cząsteczki do oddawania elektronu.

Wykazano, że przyczyną wzrostu aktywności przeciwutleniającej TEAC katechin po deprotonacji najbardziej kwasowych grup hydroksylowych jest większa zdolność tych związków do oddawania elektronu, czego odzwierciedleniem są znacznie niższe wartości IP form monoanionowych w porównaniu do form neutralnych katechin.

Z badań przedstawionych w pracy wynika również, że konfiguracja przestrzenna nie ma istotnego wpływu na aktywność przeciwutleniającą epimerów katechin. W dotychczasowej literaturze brak jest szczegółowych danych na temat aktywności przeciwutleniającej epimerów katechin.

Związki polifenolowe, działające przeciwutleniająco, mogą w zależności od stężenia oraz warunków środowiska (obecności jonów metali przejściowych, tlenu cząsteczkowego i enzymów) ulegać utlenianiu z utworzeniem toksycznych reaktywnych metabolitów o strukturze chinonów. Niekorzystny wpływ chinonów na organizm ludzki wynika z ich reakcji z makrocząsteczkami komórkowymi, co prowadzi do zmiany ich struktury i funkcji, a w konsekwencji do powstawania i rozwoju chorób cywilizacyjnych, takich jak np. nowotwory i niedokrwienne choroby serca. Chinony związków polifenolowych mogą powstawać także w wyniku chemicznego utleniania polifenoli, wynikającego z ich działania jako przeciwutleniaczy [van der Woude et al. 2005], co jest istotne ze względu na fakt, że katechiny i ekstrakty z herbaty zielonej wykorzystuje się jako naturalne przeciwutleniacze żywności oraz jako składniki wielu suplementów diety.

Jednakże, w ostatnich latach ujawniono, że powstające w wyniku utleniania związków polifenolowych silnie elektrofilowe chinony mogą wykazywać pozytywny wpływ na organizm człowieka poprzez aktywację ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne. Selektywna indukcja ekspresji tych genów może stanowić skuteczną ochronę komórek organizmu przed toksycznym działaniem ksenobiotyków i reaktywnych form tlenu. Z danych literaturowych wynika, że flawonoidy są zdolne do indukcji enzymów detoksykacyjnych. Powszechnie uważa się, że indukcja tych enzymów może odgrywać istotną rolę w prewencji nowotworów. Jednym z możliwych mechanizmów indukcji ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne jest aktywacja ich ekspresji za pośrednictwem elementu EpRE. Według Lee-Hilz i współpracowników [2006] hydroksyflawony mogą aktywować transkrypcyjnie geny zawierające w regionie promotorowym element EpRE dzięki ich właściwościom proutleniającym. Ponieważ katechiny występujące w herbacie

zielonej również posiadają właściwości proutleniające i także mogą indukować ekspresję genów kodujących enzymy detoksykacyjne, w niniejszej pracy zbadano zdolność wybranych katechin do indukcji ekspresji genu kodującego oksydoreduktazę NAD(P)H:chinon 1 – zawierającego w regionie promotorowym element EpRE oraz rolę właściwości proutleniających katechin w tej indukcji.

W toku badań przedstawionych w pracy udowodniono, że za indukcję ekspresji genu kodującego NQO1 za pośrednictwem elementu EpRE są odpowiedzialne właściwości proutleniające katechin. Potwierdzają to następujące wyniki badań:

1. Wykazano eksperymentalnie, że tylko katechiny z ugrupowaniem pyrogalolowym (epigalokatechina, galokatechina i ich galusany) są zdolne do aktywacji ekspresji genu kodującego NQO1 (rysunek 19, str. 103). Może to wynikać ze zwiększonej tendencji ugrupowania pyrogalolowego do utleniania i tworzenia chinonów.
2. Stwierdzono, że ekspresja genu NQO1 za pośrednictwem elementu EpRE jest osłabiona w komórkach EpRE-Lux z podwyższonym poziomem wewnątrzkomórkowego glutationu i podwyższona w komórkach z obniżonym poziomem glutationu (rysunek 20, str. 107), co wskazuje na istotną rolę chinonów katechin, powstających w wyniku ich działania proutleniającego, w mechanizmie tej indukcji.
3. Wykazano, przy zastosowaniu metody *in vitro* (utlenianie epigalokatechiny i galusanu epigalokatechiny w obecności tyrozynazy i glutationu), że dwie biologicznie aktywne katechiny są zdolne do utworzenia chinonów (rysunek 21, str. 110). Chinony katechin wykryto drogą pośrednią, poprzez identyfikacje ich koniugatów z glutationem, za pomocą HPLC, widm masowych LC/MS i widm ^1H NMR
4. Przy użyciu literaturowych wartości potencjałów utleniania ($E_{1/2}$) oraz różnicy ciepła tworzenia (DHF) wykazano, że zdolność katechin do indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 wynika z ich łatwości utleniania i zdolności do tworzenia chinonów (tabela 16, str. 104).

Na podstawie wyników badań stwierdzono, że najbardziej aktywnym induktorem jest galusan epigalokatechiny.

Ponadto w oparciu o wyniki badań przedstawionych w pracy wykazano, że ugrupowanie pyrogalolowe obecne w cząsteczce katechiny, a nie reszta kwasu galusowego, jak postulowano dotychczas [Chen et al. 2000], jest elementem strukturalnym katechin warunkującym ich zdolność do indukcji ekspresji genu NQO1 za pośrednictwem elementu EpRE. Potwierdzeniem tego są następujące wyniki badań:

1. Tylko katechiny zawierające ugrupowanie pyrogalolowe indukują ekspresję genu kodującego enzym NQO1.
2. Galusan epikatechiny nie wykazuje zdolności do indukcji w całym badanym zakresie stężeń.
3. Utlenianie katechin z utworzeniem ich form chinonowych ma miejsce w pierścieniu B.
4. Katechiny z ugrupowaniem pyrogalolowym charakteryzują się niższymi wartościami parametrów $E_{1/2}$ i DHF odzwierciedlającymi łatwość utleniania cząsteczki.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki poszerzają wiedzę na temat czynników decydujących o aktywności przeciwutleniającej herbat zielonych, jak i występujących w nich katechin. Wykazano, że nie tylko liczba grup OH i niezależnie aktywne przeciwrodnikowo ugrupowania strukturalne (pyrogalolowe lub katecholowe i reszta kwasu galusowego), ale także pH środowiska oraz stan protonacji katechin, który wynika z pKa najłatwiej dysocjujących grup hydroksylowych w cząsteczce mają istotny wpływ na aktywność przeciwutleniającą katechin i ekstraktów z herbat zielonych. Ponadto wykazano, że chinony katechin uznawane dotychczas za toksyczne produkty utleniania tych związków mogą mieć pozytywny wpływ na organizm człowieka poprzez selektywną indukcję ekspresji genów kodujących enzymy II fazy biotransformacji, takich jak np. oksydoreduktaza NAD(P)H:chinon 1 (NQO1). Wyniki przedstawione w pracy stanowią podstawę do dalszych badań nad aktywnością przeciw- i pro-utleniającą katechin oraz herbat zielonych *in vivo*.

Literatura

1. Abd El Mohsen M.M., Kuhnle G., Rechner A.R., Schroeter A., Rose S., Jenner P. & Rice-Evans C.A., *Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion*. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, 33, 1693-1702.
2. van Acker S., Bast A. & Wijgh W., *Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids* [w:] *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans C., Packer L. (red.) Marcel Dekker Inc., Nowy Jork, **1998**, 137-162.
3. Alghazeer R., Saeed S. & Howell N.K., *Aldehyde formation in frozen mackerel (scomber Scombrus) in the presence and absence of instant green tea*. *Food Chem.* **2008**, 108, 801-810.
4. Anderson R.E., Fisher L.J., Hara Y., Harris T., Mak W.B., Melton L.D. & Packer J.E., *Green tea catechins partially protect DNA from \cdot OH radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals*. *Carcinogenesis* **2001**, 22, 1189-1193.
5. Aron P.M. & Kennedy J.A., *Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity*. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, 52, 79-104.
6. Arts I.C., Hollman P.C., Feskens E.J., Bueno de Mesquita H.B. & Kromhout D., *Catechin intake and associated dietary and lifestyle factors in a representative sample of Dutch men and women*. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2001**, 55, 76-81.
7. Arts I.C., van de Putte B. & Hollman P.C., *Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods*. *J. Agric. Food Chem.* **2000a**, 48, 1746-1751.
8. Arts I.C., van de Putte B. & Hollman P.C., *Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk*. *J. Agric. Food Chem.* **2000b**, 48, 1752-1757.
9. Arts M.J.T.J., Haenen G.R.M.M., Voss H.-P. & Bast A., *Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein*. *Food Chem. Toxicol.* **2001**, 39, 787-791.
10. Arts M.J.T.J., Haenen G.R.M.M., Wilms L.C., Beetstra S.A.J.N., Heijnen C.G.M., Voss H.-P. & Bast A., *Interaction between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 1184-1187.
11. Awad H.M., Boersma M.G., Boeren S., van der Woude H., van Zanden J., van Bladeren P.J., Vervoort J. & Rietjens I.M.C.M., *Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system*. *FEBS Lett.* **2002a**, 520, 30-34.
12. Awad H.M., Boersma M.G., Boeren S., van Bladeren P.J., Vervoort J. & Rietjens I.M.C.M., *The regioselectivity of glutathione adduct formation with flavonoid quinone/quinone methides is pH-dependent*. *Chem. Res. Toxicol.* **2002b**, 15, 343-351.
13. Awad H.M., Boersma M.G., Vervoort J. & Rietjens I.M.C.M., *Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide-glutathione adducts*. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 378, 224-233.
14. Azam S., Hadi N., Khan N.U. & Hadi S.M., *Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implication for anticancer properties*. *Toxicol. in Vitro* **2004**, 18, 555-561.

15. Barbosa D.S., *Green tea polyphenolic compounds and human health*. J. Verbr. Lebensm. **2007**, 2, 407-413.
16. Bartosz G., *Druga twarz tlenu*, Wyd. PWN, Warszawa, **2003**.
17. Beecher G.R., *Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake*. J. Nutr. **2003**, 133, 3248S-3254S.
18. Belitz H.-D., Grosch W. & Schieberle P., *Food Chemistry*, Springer, Berlin, **2004**.
19. Boerboom A.M.J.F., Vermeulen M., van der Woude H., Bremer B.I., Lee-Hilz Y.Y., Kampmand E., van Bladeren P.J., Rietjens I.M.C.M. & Aarts J.M.M.J.G., *Newly constructed stable reporter cell lines for mechanistic studies on electrophile-responsive element-mediated gene expression reveal a role for flavonoid planarity*. Biochem. Pharmacol. **2006**, 72, 217–226.
20. Boersma M.G., Vervoort J., Szymusiak H., Lemańska K., Tyrakowska B., Cenas N., Segura-Aguilar J. & Rietjens I.M.C.M., *Regioselectivity and reversibility of the glutathione conjugation of quercetin quinone methide*. Chem. Res. Toxicol. **2000**, 13, 185-191.
21. Boots A.W., Balk J.M., Bast A. & Haenen G.R.M.M., *The reversibility of the glutathionyl-quercetin adduct spread oxidized quercetin-induced toxicity*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **2005**, 338, 93-929.
22. Borkowski T., Szumusiak H., Gliszczyńska-Świgło A., Rietjens I.M.C.M. & Tyrakowska B., *Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent*. J. Agric. Food Chem. **2005**, 53, 5526-5534.
23. Bunkova R., Marova I. & Nemeč M., *Antimutagenic properties of green tea*. Plant Foods Hum. Nutr. **2005**, 60, 25-29.
24. Cabrera C., Artach, R. & Jimenez R., *Beneficial effects of green tea – a review*. J. Am. Coll. Nutr. **2006**, 25, 79-99.
25. Cao G, Sofic E. & Prior R.L., *Antioxidant capacity of tea and common vegetables*. J. Agric. Food Chem. **1996**, 44, 3426-3431.
26. Cao G., Sofic E. & Prior R.L., *Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships*. Free Radic. Biol. Med. **1997**, 22, 749-760.
27. Chan T., Galati G. & O'Brien P.J., *Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones or flavanones*. Chem.-Biol. Int. **1999**, 122, 15-25.
28. Chen C. & Kong A.N., *Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling*. Free Radic. Biol. Med. **2004**, 36, 1505-1516.
29. Chen C., Shen G., Heber V., Hu R., Owuor E.D. & Kong A.-N.T., *Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells*. Carcinogenesis **2003**, 24, 1369-1378.
30. Chen C., Yu R., Owuor E.D. & Kong A.-N., *Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival*. Arch. Pharm. Res. **2000**, 23, 605–621.
31. Chen L., Yang X., Jiao H. & Zhao B., *Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid oxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells*. Toxicol. Sci. **2002**, 69, 149-156.

32. Chou F.-P., Chu Y.-C., Hsu J.-D., Chiang H.-C. & Wang C.-J., *Specific induction of glutathione S-transferase GSTM2 subunit expression by epigallocatechin gallate in rat liver*. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, 60, 643-650.
33. Chun O.K., Chung S.J. & Song W.O., *Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults*. *J. Nutr.* **2007**, 137, 1244-1252.
34. Chung J.Y., Huang C., Meng X., Dong Z. & Yang C.S., *Inhibition of activator protein 1 activity and cell growth by purified green tea and black tea polyphenols in H-ras-transformed cells: structure-activity relationship and mechanism involved*. *Cancer Res.* **1999**, 59, 4410-4417.
35. Cichoń Z. & Wierciak E., *Towaroznawcza charakterystyka herbaty*. Wyd. Akademii Ekonomicznej, Kraków, **2000**.
36. Cooper R., Morré J. & Morré D., *Medicinal benefits of green tea: Part I. Review of noncancer health benefits*. *J. Altern. Complement. Med.* **2005a**, 5, 521-528.
37. Cooper R., Morré J. & Morré D., *Medicinal benefits of green tea: Part II. Review of anticancer properties*. *J. Altern. Complement. Med.* **2005b**, 11, 639-652.
38. Cuppet S.L., *The use of natural antioxidants in food products of animal origin* [w:] *Antioxidants in food*, Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (red.) CRC Press, Cambridge, **2001**, 285-310.
39. Danrong Z., Yuqiong C. & Dejiang N., *Effect of water quality on the nutritional components and antioxidant activity of green tea extracts*. *Food Chem.* **2009**, 113, 110-114.
40. Dembińska-Kieć A., *Nutrigenomika a przeciwutleniacze* [w:] *Przeciwutleniacze w żywności*, Grajek W. (red.), WNT, Warszawa, **2007**, 427-441.
41. Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw D.W., Cole R.N., Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Yamamoto M. & Talalay P., *Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **2002**, 99, 11908-11913.
42. Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw D.W. & Wakabayashi N., *Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein*. *Biochem.* **2005a**, 44, 6889-6899.
43. Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw D.W. & Kensler T.W., *The role of Keap1 in cellular protective responses*. *Chem. Res. Toxicol.* **2005b**, 18, 1779-1791.
44. Dragsted L.O., Strube M. & Leth T., *Dietary levels of plant phenols and other non-nutritive components: could they prevent cancer?* *Eur. J. Cancer Prev.* **1997**, 6, 522-528.
45. Drozdowski B., *Lipidy* [w:] *Chemia żywności. Skład, przemiany i właściwości żywności*, Sikorski Z.E. (red.), WNT, Warszawa, **2002**, 171-228.
46. Duda-Chodak A. & Tuszyński T., *Wpływ reaktywnych wolnych rodników na organizmy żywe* [w:] *Przeciwutleniacze w żywności*, Grajek W. (red.), WNT, Warszawa, **2007**, 46-64.
47. Elbling L., Weiss R.-M., Teufelhofer O., Uhl M., Knasmüller S., Schulte-Hermann R., Berger W. & Micksche M., *Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities*. *FASEB J.* **2005**, 19, 807-809.

48. Feng W.Y., *Metabolism of green tea catechins: an overview*. Curr. Drug Metab. **2006**, 7, 755-809.
49. Firuzi O., Lacanna A., Petrucci R., Marrosu G. & Saso L., *Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by ferric reducing antioxidant power assay and cyclic voltammetry*. Biochim. Biophys. Acta **2005**, 1721, 174-184.
50. Franczyk-Żarów M., Kostogrys R.B. & Pisulewski P., *Wzbogacanie żywności pochodzenia zwierzęcego w związki przeciwutleniające [w:] Przeciwutleniacze w żywności*, Grajek W. (red.), WNT, Warszawa, **2007**, 223-228.
51. Frei B. & Higdon J.V., *Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies*. J. Nutr. **2003**, 133, 3275S-3284S.
52. Friedman M. & Jürgens H.S., *Effect of pH on the solubility of plant phenolic compounds*. J. Agric. Food Chem. **2000**, 48, 2101-2110.
53. Furukawa A., Oikawa S., Murata M., Hiraku Y. & Kawanishi S., *(-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA*. Biochem. Pharmacol. **2003**, 66, 1769-1778.
54. Galati G. & O'Brien P., *Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties*. Free Radic. Biol. Med. **2004**, 37, 287-303.
55. Galati G., Chan T., Wu B. & O'Brien P.J., *Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids*. Chem. Res. Toxicol. **1999**, 12, 521-525.
56. Galati G., Lin A., Sultan A.M. & O'Brien P.J., *Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins*. Free Radic. Biol. Med. **2006**, 40, 570-580.
57. Galati G., Moridiani M.Y., Chan T. & O'Brien P.J., *Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation*. Free Radic. Biol. Med. **2001**, 30, 370-382.
58. Galati G., Sabzervari O., Wilson J.X. & O'Brien P.J., *Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics*. Toxicology **2002**, 177, 91-104.
59. Gao Y.T., McLaughlin J.K., Blot W.J., Ji B.T., Dai Q. & Fraumeni J.F., *Reduced risk of esophageal cancer associated with green tea consumption*. J. Natl. Cancer Inst. **1994**, 86, 855-858.
60. Gliszczyńska-Świąło A., Ciska E., Pawlak-Lemańska K., Chmielewski J., Borkowski T. & Tyrakowska B., *Changes in the content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing*. Food Addit. Conatm. **2006**, 23, 1088-1098.
61. Gliszczyńska-Świąło A. & Tyrakowska B., *Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the TEAC antioxidant activity*. J. Food Sci. **2003**, 68, 1844-1849.
62. Gorczyca A., *Kawa czy herbata? Co Polacy piją podczas pracy?*, Internet: biznestrendy.infor.pl, kategoria: Analizy i raporty, data dodania 26 marca **2008**.
63. Gordon M.H., *The development of oxidative rancidity in foods [w:] Antioxidants in food*, Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (red.) CRC Press, Cambridge, **2001**, 7-21.

64. Graham H.N., *Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry*. *Prev. Med.* **1992**, 21, 334-350.
65. Grajek W., Olejnik A. & Sip A., *Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods*. *Acta Biochim. Pol.* **2005**, 52, 665-671.
66. Gramza A. & Korczak J., *Tea constituents (Camellia sinensis L.) as antioxidants in lipid system*. *Trends Food Sci. Technol.* **2005b**, 16, 351-358.
67. Gramza A., Khokhar S., Yoko S., Gliszczyńska-Świgło A., Hes M. & Korczak J., *Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2006**, 108, 351-362.
68. Gramza A., Korczak J. & Amarowicz R., *Tea polyphenols – their antioxidant properties and biological activity – a review*. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2005a**, 14, 219-235.
69. Gramza-Michałowska A. & Reguła J., *Use of tea extracts (Cammelia sinensis) in jelly candies as polyphenols sources in human diet*. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2007a**, 16, 85-88.
70. Gramza-Michałowska A., Korczak J. & Reguła J., *Use of plant extracts in summer and Winter season butter oxidative stability improvement*. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2007b**, 16, 85-88.
71. Grzymisławski M., *Podstawy nauki o żywieniu [w:] Żywieniu człowieka*, Gawęcki J., Hryniewski L. (red.), PWN, Warszawa, **2000**, 56-72.
72. Guo Q., Zhao B., Shen S., Hou J., Hu J. & Xin W., *ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, 1427, 13-23.
73. Halliwell B. & Gutteridge J.M.C., *Free radical in biology and medicine*, Oxford University Press Inc., Nowy Jork, **2007**.
74. Halliwell B., *Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?* *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, 476, 107-112.
75. Hara Y., *Green tea. Health benefits and applications*. Marcel Dekker Inc., Nowy Jork, **2001**.
76. Hashimoto F., Ono M., Masuaka C., Ito Y., Sakata Y., Shimizu K., Nonaka G.-I., Nishioka I. & Nohara T., *Evaluation of the anti-oxidative effect (in vitro) of tea polyphenols*. *Biosci Biotechnol. Biochem.* **2003**, 67, 396-401.
77. Hayakawa F., Ishizu Y., Hoshino N., Yanaji A., Ando T. & Kimura T., *Prooxidative activities of tea catechins in the presence of Cu²⁺*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, 68, 1825-1830.
78. Hayakawa F., Kimura T., Meada T., Fujita M., Sohmiya H. & Ando T., *DNA cleavage reaction and linoleic acid peroxidation induced by tea catechins in the presence of cupric ion*. *Bioshim. Biophys. Acta* **1997**, 1336, 123-131.
79. Henning S.M., Fajardo-Lira C., Lee H.W., Youssefian A.A., Go V.L.W. & Heber D., *Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity*. *Nutr. Cancer* **2003**, 45, 226-235.
80. Herrero-Martinez J.M., Sanmartin M., Roses M., Bosch E. & Rafols C., *Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis*. *Electrophoresis* **2005**, 28, 1886-1895.

81. Higdon J.V. & Frei B., *Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **2003**, 43, 89-143.
82. Ho C-T., Rafi M.M. & Ghai G., *Bioactive substance: nutraceuticals and toxicatns* [w:] *Fennema's Food chemistry*, Damodaran S., Parkin K.L., Fennema O.R. (red.), CRC Press Taylor and Francis Group, Nowy Jork, **2007**, 751-780.
83. Horžić D., Komes D., Belščak A., Ganić K.K., Iveković D. & Karlović D., *The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbat infusion*. Food Chem. **2009**, in Press.
84. Hsu C-H., Tsai T-H., Kao Y-H., Hwang K-C., Tseng T-Y. & Chou P., *Effect of green tea extract on obese women: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial*. Clin. Nutr. **2008**, 27, 363-370.
85. Huang S.-W. & Frankel E.N., *Antioxidant activity of green tea catechins in different lipid systems*. J. Agric. Food Chem. **1997**, 45, 3033-3038.
86. Ignatowicz E., *Działanie ochronne przeciwutleniaczy w chorobach układu krążenia* [w:] *Przeciwutleniacze w żywności*, Grajek W. (red.), WNT, Warszawa, **2007**, 261-269.
87. Internet: <http://www.yesteahouse.com/teainfo.html>, data pobrania 10 styczeń 2009
88. Intra J. & Kuo S.-M., *Physiological levels of tea catechins increase cellular lipid antioxidant activity of vitamin C and vitamin E in human intestinal Caco-2 cells*. Chem.-Biol. Int. **2007**, 169, 91-99.
89. Itoh K., Tong K. I. & Yamamoto M., *Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles*. Free Radic. Biol. Med. **2004**, 36, 1208-1213.
90. Janeiro P. & Brett A.M.O., *Catechin electrochemical oxidation mechanism*. Anal. Chim. Acta. **2004**, 518, 109-115.
91. Jovanovic S.V., Hara Y., Steenken S. & Simic M.G., *Antioxidant potential of galliccatechins. A pulse radiolysis and laser photolysis study*. J. Am. Chem. Soc. **1995**, 117, 9881-9888.
92. Jovanovic S.V., Steenken S., Simic M.G. & Hara Y., *Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reaction of flavonoids radical* [w:] *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans C., Packer L. (red.) Marcel Dekker Inc., Nowy Jork, **1998**, 137-162.
93. Jovanovic S.V., Steenken S., Tosie M., Marjanovic B. & Simic M.G., *Flavonoids as antioxidants*. J. Am. Chem. Soc. **1994**, 116, 4846-851.
94. Ju J., Lu G., Lambert J.D. & Yang C.S., *Inhibition of carcinogenesis by tea constituents*. Semin. Cancer Biol. **2007**, 17, 395-402.
95. Kakuzō O., *Księga herbaty*, Państwowy Instytut Wydawniczy, Warszawa, **1986**.
96. Kanadzu M., Lu Y. & Morimoto K., *Dual function of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) in healthy human lymphocytes*. Cancer Lett. **2006**, 241, 250-255.
97. Kao Y.-H., Chang H.-H., Lee M.-J. & Chen C.-L., *Tea, obesity, and diabetes*. Mol. Nutr. Food Res. **2006**, 50, 188-210.
98. Kawai Y., Matsui Y., Kondo H., Morinaga H., Uchida K., Miyoshi N. & Nakamura Y., Osawa T., *Galloylated catechins as potent inhibitors of hypochlorous acid-induced DNA damage*. Chem Res Toxicol. **2008**, 21, 1407-1414.

99. Kennedy J.A., Munro M.H.G., Powell H.K.J., Porter L.J. & Yeap Foo L., *The protonation reactions of catechin, epicatechin and related compounds*. *Aust. J. Chem.* **1984**, 37, 885-892.
100. Klaunig J.E., Xu Y., Han C., Kamendulis L.M., Chen J., Heiser C., Gordon M.S. & Mohler E.R., *The effect of tea consumption on oxidative stress in smokers and nonsmokers*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1999**, 220, 249-254.
101. Klimczak I, Małecka M., Szlachta M & Gliszczyńska-Świgło A., *Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices*. *J. Food Comp. Anal.* **2007**, 20, 313-322.
102. Ko C.H., Li K., Ng P.C., Fung K.P., Li C.L., Wong R.P., Chui K.M., Gu G.J., Yung E., Wang C.C. & Fok T.F., *Pro-oxidative effects of tea and polyphenols, epigallocatechin-3-gallate and epigallocatechin, on G6PD-deficient erythrocytes in vitro*. *Int. J. Mol. Med.* **2006**, 18, 987-994.
103. Kobayashi M. & Yamamoto M., *Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species*. *Adv. Enzyme Regul.* **2006**, 46, 113-140.
104. Kondo K., Kurihara M., Miyata N., Suzuki T. & Toyoda M., *Scavenging mechanisms of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epicatechin gallate on peroxy radicals and formation of superoxide during the inhibitory action*. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 27, 855-863.
105. Krajka-Kuźniak V., *Indukcja enzymów II fazy jako strategia chemioprewencji nowotworów i innych schorzeń degeneracyjnych*. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **2007**, 61, 627-638.
106. Lambert J.D. & Yang C.S., *Mechanisms of cancer prevention by tea constituents*. *J. Nutr.* **2003**, 133, 3262S-3267S.
107. Lambert J.D., Sang S. & Yang C.S., *Biotransformation of green tea polyphenols and biological activities of those metabolites*. *Mol. Pharm.* **2007**, 4, 819-825.
108. Landau J.M., Lambert J.D., Lee M-J. & Yang C.S., *Cancer Prevention by tea and tea constituents [w:] Carcinogenic and anticarcinogenic food components*, Baer-Dubowska W., Bartoszek A., Malejka-Giganti D. (red), CRC Press Taylor and Francis, Nowy Jork, **2005**, 219-237.
109. Langley-Evans S.C., *Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay*. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2000**, 51, 181-188.
110. Lee-Hilz Y.Y., Boerboom A.M., Westphal A.H., Berkel W.J., Aarts J.M. & Rietjens I.M., *Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression*. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, 19, 1499-1505.
111. Lemańska K., Szymusiak H., Tyrakowska B., Zieliński R., Soffers A.E.M.F. & Rietjens I.M.C.M., *The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones*. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, 31, 869-881.
112. Lotito S.B. & Fraga C.G., *Catechins delay lipid oxidation and tocopherol and carotene depletion following ascorbate depletion in human plasma*. *PSEBM* **2000**, 225, 32-38.
113. Luning P.A., Marcelis W.J. & Jongen W.M.F., *Zarządzanie jakością żywności, ujęcie technologiczno-menedżerskie*, WNT, Warszawa, **2005**.

114. Łuczaj W. & Skrzydlewska E., *Antioxidant properties of black tea*. *Prev. Med.* **2005**, 40, 910-918.
115. Mabe K., Yamada M., Oguni I. & Takahaschi T., *In vitro and in vivo activities of tea catechins against Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemoth.* **1999**, 43, 1788-1791.
116. Majchrzak D., Mitter S. & Elmadfa I., *The effect of ascorbic acid on total antioxidant activity of black and green teas*. *Food Chem.* **2004**, 88, 447-451.
117. Małecka, M., *Żywność bezpieczna dla konsumenta*, Wyd. AE w Poznaniu, Poznań, 2006.
118. Miller N.J., Rice-Evans C., Davis M.J., Gopinathan V. & Milner A., *A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates*. *Clin. Sci.* **1993**, 84, 407-412.
119. Mitsumoto M., O'Grady M.N., Kerry J.P. & Buckley D.J., *Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties*. *Meat Sci.* **2005**, 69, 773-779.
120. Morel I., Cillard P. & Cillard J., *Flavonoid-metal interaction in biological systems* [w:] *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans C., Packer L. (red.) Marcel Dekker Inc., Nowy Jork, **1998**, 163-177.
121. Mukai K., Mitani S., Ohara K. & Nagaoka S.-I., *Structure-activity relationship of the tocopherol-regeneration reaction by catechins*. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, 38, 1243-1256.
122. Murakami C., Hirakawa Y., Inui H., Nakano Y. & Yoshida H., *Effect of tea catechins on cellular lipid peroxidation and cytotoxicity in HepG2 cells*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, 66, 1559-1562.
123. Muzolf M. & Tyrakowska B., *Prozdrowotne właściwości zielonej herbaty*. *Żywnie i Człowieka i Metabolizm*, **2007a**, 3/4, 1225-1229.
124. Muzolf M., Gliszczyńska-Świgło A. & Tyrakowska B., *The radical scavenging capacity of green tea*. *Pol. J. Nat. Sci.* **2007b**, Supp. 4, 63-69.
125. Muzolf M., Szymusiak H., Gliszczyńska-Świgło A., Rietjens I.M. & Tyrakowska B., *pH-dependent radical scavenging capacity of green tea catechins*. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, 816-823.
126. Muzolf-Panek M., Gliszczyńska-Świgło A., de Haan L., Aarts J.M.M.J.G., Szymusiak H., Vervoort J.M., Tyrakowska B. & Rietjens I.M.C.M., *Role of catechin quinones in the induction of EpRE-mediated gene expression*. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, 21, 2352-2360.
127. Muzolf-Panek M., Gliszczyńska-Świgło A., Szymusia H & Tyrakowska B., *The influence of pH on the radical scavenging capacity of the catechin epimers.* – artykuł w przygotowaniu
128. Nakagawa H., Hasumi K., Woo J.-T., Nagai K. & Wachi M., *Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate*. *Carcinogenesis* **2004**, 25, 1567-1574.
129. Nakagawa T. & Yokozawa T., *Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea*. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, 40, 1745-1750.

130. Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M. & Hara Y., *Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical*. Free Radic. Biol. Med. **1996**, 21, 895-902.
131. Nanjo F., Mori M., Goto K. & Hara Y., *Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **1999**, 63, 1621-1623.
132. Navarro-Martinez M.D., Navarro-Peran E., Cabezas-Herrera J., Ruiz-Gómez J., García-Cánovas F. & Rodríguez-López J.N., *Antifolate activity of epigallocatechin gallate against Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob. Agents Chemoth. **2005**, 49, 2914-2920.
133. Ohmori R., Iwamoto T., Tago M., Takeo T., Unno T., Itakura H. & Kondo K., *Antioxidant activity of various teas against free radical and LDL oxidation*. Lipids **2005**, 40, 849-853.
134. Ozimek I., *Bezpieczeństwo żywności w aspekcie ochrony konsumenta w Polsce*, Wyd. SGGW, Warszawa, **2006**.
135. Pan T., Jankovic J. & Le W., *Potential therapeutic properties of green tea polyphenols in Parkinson's disease*. Drugs Aging **2003**, 20, 711-721.
136. Pannala A., Rice-Evans C., Halliwell B. & Singh S., *Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **1997**, 232, 164-168.
137. Paquay J.B.G., Haenen G.R.M.M., Tender G., Wiseman S.A., Tijburg L.B.M. & Bast A., *Protection against nitric oxide toxicity by tea*. J. Agric. Food Chem. **2000**, 48, 5768-5772.
138. Peters U., Poole C. & Arab L., *Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis*. Am. J. Epidemiol. **2001**, 154, 495-503.
139. Pettigrew J., *Królestwo herbaty*. Wyd. Twój Styl, Warszawa, **1998**.
140. Pietta P.-G., *Flavonoids as antioxidant*. J. Nat. Prod. **2000**, 63, 1035-1042.
141. Pokorny J. & Schmidt S., *Natural antioxidant functionality during food processing* [w:] *Antioxidants in food*, Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (red.) CRC Press, Cambridge, **2001a**, 331-354.
142. Pokorny J., Trojakova L. & Takacsova M., *The use of natural antioxidants in food products of plant origin* [w:] *Antioxidants in food*, Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (red.) CRC Press, Cambridge, **2001b**, 355-368.
143. Porter W.L., Black E.D. & Drolet A.M., *Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems*. J. Agric. Food Chem. **1989**, 37, 615-624.
144. Potapovich A.I. & Kostyuk V.A., *Comparative study of antioxidant properties and cytoprotective activity of flavonoids*. Biochemistry (Moscow) **2003**, 68, 632-638.
145. Raport RASFF **2006**, Internet: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm
146. Rice-Evans C. & Miller N., *Structure- antioxidant activity relationships of flavonoids and isoflavonoids* [w:] *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans C. i Packer L. (red.) Marcel Dekker Inc., Nowy Jork, **1998**, 221-252.
147. Rice-Evans C.A., Miller N.J. & Paganga G., *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. Free Radic. Biol. Med. **1996**, 20, 933-956.

148. Riemersma R.A., Rice-Evans C.A., Tyrrell R.M., Clifford M.N. & Lean M.E., *Tea flavonoids and cardiovascular health*. *O. J. Med.* **2001**, 94, 277-282.
149. Rietveld A. & Wiseman S., *Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials*. *J. Nutr.* **2003**, 133, 3285S-3292S.
150. Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej 2007, GUS.
151. Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej 2008, GUS.
152. Rusak G., Komes D., Likić S., Horžić D. & Kovač M., *Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used*. *Food Chem.* **2008**, 110, 852-858.
153. Saffari Y & Sadrzadeh S.M.H., *Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro*. *Life Sci.* **2004**, 74, 1513-1518.
154. Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G.P. & Rice-Evans C., *Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and chain-breaking antioxidants*. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, 322-339.
155. Sánchez-Moreno C., Larrauri J.A. & Saura-Calixto F., *A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols*, *J. Sci. Food Agric.* **1998**, 76, 270-276.
156. Sang S., Hou Z., Lambert J.D. & Yang C.S., *Redox properties of tea polyphenols and related biological activities*. *Antiox. Redox Signal.* **2005a**, 7, 1704-1714.
157. Sang S., Lambert J.D., Hong J., Tian S., Lee M.-J., Stark R.E., Ho C.-T. & Yang C.S., *Synthesis and structure identification of thiol conjugates of (-)-epigallocatechin gallate and their urinary levels in mice*. *Chem Res. Toxicol.* **2005b**, 18, 1762-1769.
158. Sang S., Yang I., Buckley B., Ho C.-T. & Yang C.S., *Autoxidative quinone formation in vitro and metabolite formation in vivo from tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: studies by real-time mass spectrometry combined with tandem mass ion mapping*. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, 43, 362-371.
159. Satoh E., Tohyama N. & Nishimura M., *Comparison of the antioxidant activity of roasted tea with green, oolong, and black teas*. *Iner. J. Food Sci. Nutr.* **2005**, 56, 551-559.
160. Sauerwald N., Schwenk M., Polster J. & Bengsch E., *Spectrometric pK determination of daphnetin, chlorogenic acid and quercetin*. *Z. Naturforschung* **1998**, 53B, 315-321.
161. Serafini M., Ghiselli A. & Ferro Luzzi A., *In vivo antioxidant effect of green and black tea in man*. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1996**, 50, 28-32.
162. Singleton V.L. & Rossi J.A., *Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent*. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, 16, 144-158.
163. Slabbert N.P., *Ionization potential of flavanols and dihydroflavonols*. *Tetrahedron* **1977**, 33, 821-824.
164. Song J.-M., Lee K.-H. & Seong B.-L., *Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus*. *Antiviral Res.* **2005**, 68, 66.
165. Stevenson D.E. & Hurst R.D., *Polyphenolic phytochemicals – just antioxidant or much more?* *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, 64, 2900-2916.

166. Sugihara N., Ohnishi M., Imamura M. & Furuno K., *Differences in antioxidative efficiency of catechins in various metal-induced lipid peroxidations in cultured hepatocytes*. J. Health Sci. **2001**, 47, 99-106.
167. Sung H., Nah J., Chun S., Park H., Yang S.E. & Min W.K., *In vivo antioxidant effect of green tea*. Eur. J. Clin. Nutr. **2000**, 54, 527-529.
168. Śmiechowska A., Bartoszek A. & Namieśniak J., *Przeciwrakowe właściwości glukozylanów zawartych w kapuście (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) oraz produktów ich rozpadu*. Postępy Hig. Med. Dośw. **2008**, 62, 125-140.
169. Tang S.Z., Kerry J.P., Sheehan D. & Buckley D.J., *Antioxidant mechanisms of tea catechins in chicken meat systems*. Food Chem. **2002**, 76, 45-51.
170. Tang S.Z., Ou S.Y., Huang X.S., Li W., Kerry J.P. & Buckley D.J., *Effects of added tea catechins on colour stability and lipid oxidation in minced beef patties held under aerobic and modified atmospheric packaging conditions*. J. Food Engin. **2006**, 77, 248-253.
171. Tyrakowska B., Lemańska K., Szymusiak H., Borkowski T. & Rietjens I.M.C.M., *Modified TEAC test for determination of the antioxidant properties of dietary polyphenolic compounds over a wide pH range*. Pol. J. Food Nutr. Sci. **2003**, 12, 141-148.
172. Tyrakowska B., Soffers A.E.M.F., Szymusiak H., Boeren S., Boersma M.G., Lemańska K., Vervoort J. & Rietjens I.M.C.M., *TEAC antioxidant activity of 4-hydroksybenzoates*. Free Radic. Biol. Med. **1999**, 27, 1427-1436.
173. Vali B., Rao L.G. & El-Sohemy A., *Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells*. J. Nutr. Biochem. **2007**, 18, 341-347.
174. Walle, T., Vincent, T. S. & Walle, U. K., *Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells*. Biochem Pharmacol. **2003**, 65, 1603-1610.
175. Waszkiewicz-Robak B., *Herbata, kawa, kakao [w:] Towaroznawstwo żywności przetworzonej*, Świdorski F. (red.), Wyd. SGGW, Warszawa, **2003**, 427-449.
176. Weinreb O., Mandel S., Amit T. & Youdim M.B.H., *Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases*. J. Nutr. Biochem. **2004**, 15, 506-516.
177. Więclawek A., Wydmuch Z., Mazurek U., Besler P. & Pacha J., *NFκB activating factors in inflammatory processes*. Ann. Acad. Med. Siles. **2006**, 60, 66-70.
178. Williams R.J., Spencer J.P.E. & Rice-Evans C., *Flavonoids: antioxidants or signaling molecules?* Free Radic. Biol. Med. **2004**, 36, 838-849.
179. Wilska-Jeszka J., *Inne naturalne składniki żywności [w:] Chemia żywności. Skład, przemiany i właściwości żywności*, Sikorski Z.E. (red.), WNT, Warszawa, **2002**, 457-481.
180. Wiśniewska, M., *Od gospodarstwa do stołu. Organizacja i zarządzanie jakością oraz bezpieczeństwem produktu żywnościowego*, Wyd. Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk, **2005**.
181. van der Woude, H., Alink, G. M., van Rossum, B. E. J., Walle, K., van Steeg, H., Walle, T. & Rietjens, I. M. C. M., *Formation of transient covalent protein and DNA adducts by*

- quercetin in cells with and without oxidative enzyme activity*. Chem. Res. Toxicol. **2005**, 18, 1907-1916.
182. Xu J.Z., Yeung S.V.Y., Chang Q., Huang Y. & Chen Z.-Y., *Comparison of antioxidant activity and bioavailability of tea epicatechins with their epimers*. Brit. J. Nutr. **2004**, 91, 873-881.
183. Yamaguchi K., Honda M., Ikigai H., Hara Y. & Shimamura T., *Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)*. Antiviral Res. **2002**, 53, 19-34.
184. Yamamoto T., Hs S., Lewis J., Wataha J., Dickinson D., Sinhg B., Bollag W.B., Lockwood P., Ueta E., Osaki T. & Schuster G., *Green tea polyphenols causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells*. J. Pharmacol. Exp. Ther. **2003**, 307, 230-236.
185. Yang B., Kotani A., Aral K. & Kusu F., *Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials*. Anal. Sci. **2001**, 17, 599-604.
186. Yang C.S., Lambert J.D., Ju J., Lu G. & Sang S., *Tea and cancer prevention: Molecular mechanisms and human relevance*. Toxicol. Appl. Pharmacol. **2007**, 224, 265-273.
187. Yang C.S., Lee M.-J. & Chen L., *Human salivary tea catechin level and catechin esterase activities: implication in human cancer prevention studies*. Cancer Epidemiol. Biom. Prev. **1999**, 8, 83-89.
188. Yang C.S., Liao J., Yang G.-Y. & Lu G., *Inhibition of lung tumorigenesis by tea*. Exp. Lung Res. **2005**, 31, 135-144.
189. Yang G., Shu X.-O., Li H., Chow W.-H., Ji B.-T., Zhang X., Gao Y.-T. & Zheng W., *Prospective cohort study of green tea consumption and colorectal cancer risk in women*. Cancer Epidemiol. Biom. Prev. **2007**, 16, 1219-1223.
190. Yang S.-P., Wilson K., Kawa A. & Raner G.M., *Effects of green tea extracts on gene expression in HepG2 and Cal-27 cells*. Food Chem. Toxicol. **2006**, 44, 1075-1081.
191. Yanishlieva-Maslarova N., *Inhibiting oxidation [w:] Antioxidants in food*, Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (red.) CRC Press, Cambridge, **2001**, 22-70.
192. Yilmaz Y., *Novel uses of catechins in foods*. Trends Food Sci. Technol. **2006**, 17, 64-71.
193. Yokozawa T., Dong E., Nakagawa T., Kashiwagi H., Nakagawa H., Takeuchi S. & Chung H.Y., *In vitro and in vivo studies on the radical-scavenging activity of tea*. J. Agric. Food Chem. **1998**, 46, 2143-2150.
194. Zhou B., Wu L.-M., Yang L. & Liu Z.-L., *Evidence for α -tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micelles*. Free Radic. Biol. Med. **2005**, 38, 78-84.
195. Ziemiński Ś. & Wartanowicz M., *Rola antyoksydantów w zapobieganiu i leczeniu chorób degeneracyjnych [w:] Antyoksydanty w żywności; Aspekty technologiczne i zdrowotne (II Konferencja naukowa „Żywność a zdrowie”)*, Wyd. Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Łódź, **1999**, 11-17.

Spis tabel

Tabela 1. Główni producenci herbaty na świecie.....	12
Tabela 2. Herbata w prewencji nowotworów: wyniki badań laboratoryjnych na zwierzętach	14
Tabela 3. Skład chemiczny świeżych liści herbaty i herbaty zielonej oraz herbaty czarnej. Zawartość poszczególnych składników wyrażona jako % suchej masy	16
Tabela 4. Związki polifenolowe herbaty zielonej. Zawartość wyrażona jako % suchej masy liści	18
Tabela 5. Struktury chemiczne katechin herbaty zielonej wraz z oznaczeniem konfiguracji przestrzennej.....	21
Tabela 6. Zawartość katechin (głównie (+)-katechiny i (-)-epikatechiny) w wybranych owocach.....	23
Tabela 7. Aktywność przeciwutleniająca <i>in vitro</i> wybranych katechin oraz dla porównania flawonoli, kwasu galusowego, α -tokoferolu i/lub witaminy C wyrażona jako zdolność zmiatania rodnika ABTS ^{•+} (metoda TEAC) ^(a) , O ₂ ^{•-} (radioliza pulsacyjna) ^(b, c) , ¹ O ₂ (fotoliza laserowa) ^(b) , HOCl ^(d) , ONOO ⁻ ^(e)	28
Tabela 8. Aktywność przeciwutleniająca katechin <i>in vitro</i>	30
Tabela 9. Zalety (zaznaczone kolorem zielonym) i wady (zaznaczone kolorem pomarańczowym) przeciwutleniaczy syntetycznych i naturalnych	54
Tabela 10. Zawartość poszczególnych katechin, katechin ogółem (TCC) oraz całkowita zawartość polifenoli (TPC) w wodnych ekstraktach z herbat zielonych (A, B, C, D, E i F). Badane katechiny oznaczono następującymi skrótami: katechyna (C), epikatechyna (EC), epigalokatechyna (EGC), galokatechyna (GC), galusan galokatechiny (GCG), galusan epikatechiny (ECG) i galusan epigalokatechiny (EGCG).....	74
Tabela 11. Wartości TEAC wodnych ekstraktów z herbat zielonych wyznaczone zmodyfikowaną metodą TEAC (n=3) oraz wartości TEAC _(DPPH) i IC ₅₀ badanych ekstraktów oznaczone metodą DPPH (n=3)	77
Tabela 12. Całkowita zawartość związków polifenolowych oszacowana na podstawie równania zależności przedstawionej na rysunku 11 (TEAC = 0,00788•TPC + 1,4464)	80
Tabela 13. Wartości TEAC wyznaczone za pomocą zmodyfikowanej metody oraz literaturowe wartości TEAC [Rice-Evans et al. 1996] katechin	84
Tabela 14. Doświadczalne i obliczone wartości pKa oraz literaturowe wartości energii deprotonacji (DE) katechin występujących w herbacie zielonej oraz galusanu metylu.....	91
Tabela 15. Wartości TEAC form neutralnych (N) katechin i literaturowe wartości energii dysocjacji wiązania O-H (BDE) oraz wartości potencjałów jonizacji (IP) formy neutralnej (N) i monoanionowej (A) katechin i galusanu metylu [Muzolf et al. 2008].....	96
Tabela 16. Maksymalne wartości współczynników indukcji (IF) badanych katechin, jak również wartości potencjałów utleniania (E _{1/2}) [Yang et al. 2001] oraz wartości różnicy ciepła tworzenia (DHF) [Muzolf-Panek et al. 2008]	104

Spis rysunków

Rysunek 1. Wpływ procesu obróbki herbaty na zawartość związków polifenolowych.....	17
Rysunek 2. Mechanizm przeciwutleniającego działania flawonoidów na przykładzie zmiatania rodników nadtlenkowych (ROO [•]) przez katechinę.....	26
Rysunek 3. Mechanizm chelatowania jonów metali przejściowych przez ugrupowanie katecholowe katechin	27
Rysunek 4. Mechanizm proutleniającego działania katechin w obecności metali na przykładzie galusanu epigalokatechiny (EGCG). Oznaczenia: SQ EGCG – semichinon galusanu epigalokatechiny, Q EGCG – chinon galusanu epigalokatechiny, RFT – reaktywne formy tlenu [Furukawa et al. 2003].....	39
Rysunek 5. Utlenianie galusanu epigalokatechiny (EGCG) w obecności peroksydazy (HRP) oraz glutationu (GSH) lub cysteiny (Cy) w pH 5,5. Produktami pośrednimi reakcji są chinony EGCG, a produktami końcowymi koniugaty EGCG z GSH lub Cy: (1) 2'-R-EGCG oraz (2) 2''-R-EGCG [Sang et al. 2005b, 2007].....	41
Rysunek 6. Mechanizm proutleniającego działania flawonoidów na przykładzie kwercetyny Oznaczenia na rysunku: GSH – glutation; B-SH – białka [Boots et al. 2005].....	42
Rysunek 7. Mechanizm ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne za pośrednictwem elementu kontrolującego EpRE. Pozostałe oznaczenia na rysunku: PKC – kinaza białkowa C, PERK – kinaza białkowa retikulum endoplazmatycznego, MAPK – kinazy białkowe aktywowane mitogenami, Ser40 – seryna, C273 i C288 – cysteiny, Keap1 – białko represorowe	49
Rysunek 8. Wzory strukturalne badanych katechin	59
Rysunek 9. Całkowita zawartość związków polifenolowych oraz zawartość katechin w wodnych ekstraktach z herbat zielonych (n=3). Wykres sporządzony na podstawie wyników zawartych w tabeli 10.	75
Rysunek 10. Procentowy udział poszczególnych katechin w ogólnej zawartości katechin w wodnych ekstraktach z herbat zielonych (n=3). Wykres sporządzony na podstawie wyników zawartych w tabeli 10. Badane katechiny oznaczono następującymi skrótami: katechyna (C), epikatechyna (EC), epigalokatechyna (EGC), galokatechyna (GC), galusan galokatechiny (GCG), galusan epikatechiny (ECG) i galusan epigalokatechiny (EGCG).	76
Rysunek 11. Zależność aktywności przeciwutleniającej TEAC ekstraktów z herbat zielonych od ogólnej zawartości w nich związków polifenolowych; współczynnik korelacji R = 0,958, p = 0,0002. Wykres sporządzono na podstawie danych zawartych w tabelach 10 i 11 oraz danych literaturowych [Muzolf et al. 2007b].....	79
Rysunek 12. Wpływ pH na wartość TEAC wodnych ekstraktów z herbat zielonych (A, B, C, D, E i F). Okienko na rysunku b) przedstawia jednocześnie wszystkie zależności wartości TEAC badanych ekstraktów z herbat od pH środowiska	82
Rysunek 13. Zależność aktywności przeciwutleniającej TEAC od pH dla wybranych katechin podstawionych grupą katecholową (epikatechyna) lub pyrogalolową (epigalokatechyna) oraz grupą katecholową lub pyrogalolową i resztą kwasu galusowego (odpowiednio galusan epikatechiny i galusan epigalokatechiny).....	85

Rysunek 14. Wpływ pH środowiska na wartości TEAC galusanu metylu – związku modelowego zawierającego resztę kwasu galusowego w cząsteczce	86
Rysunek 15. Wpływ pH na wartość TEAC katechin: a) epimerów: epikatechiny i katechiny, b) epimerów: epigalokatechiny i galokatechiny, c) epimerów: galusanu epigalokatechiny i galusanu galokatechiny	88
Rysunek 16. Zależność eksperymentalnych wartości pKa od literaturowych teoretycznych wartości energii deprotonacji DE ($R = 0,975$, $p = 0,0002$). Dla katechiny wykorzystano wartości pKa wyznaczone przez Kennedy i współpracowników [1984].....	92
Rysunek 17. Zależność aktywności przeciwutleniającej TEAC od pH dla a) galusanu epigalokatechiny i krzywa teoretycznej zależności sumy wartości TEAC epigalokatechiny i galusanu metylu od pH oraz b) galusanu epikatechiny i krzywa teoretycznej zależności sumy wartości TEAC epikatechiny i galusanu metylu od pH środowiska	94
Rysunek 18. Poziom indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 przez katechiny. Wartość współczynnika indukcji (IF – <i>ang. Induction Factor</i>) jest średnią z trzech niezależnych eksperymentów	102
Rysunek 19. Poziom indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 przez 100 μ M roztwór: C – katechiny, EC – epikatechiny, ECG – galusanu epikatechiny, EGC – epigalokatechiny, GC – galokatechiny, EGCG – galusanu epigalokatechiny i GCG – galusanu galokatechiny. Wartość współczynnika indukcji (IF) jest średnią z trzech niezależnych eksperymentów	103
Rysunek 20. Poziom indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 przez katechiny oraz <i>tert</i> -butylohydrochinon (tBHQ), jak również próbkę kontrolną (0,5% DMSO) w komórkach EpRE-Lux z niezmienionym (0 mM NAC i 0 μ M BSO), podwyższonym (40 mM NAC) lub obniżonym (100 μ M BSO) poziomem glutationu. Wartość współczynnika indukcji (IF) jest średnią z trzech niezależnych eksperymentów. * wskazuje na istotną różnicę w porównaniu do próbki o niezmienionym poziomie glutationu (test t-Studenta, $p < 0,05$). Badane katechiny oznaczono następującymi skrótami: C – katechyna, EC – epikatechyna, ECG – galusan epikatechiny, EGC – epigalokatechyna, GC – galokatechyna, EGCG – galusan epigalokatechiny i GCG – galusan galokatechiny.....	107
Rysunek 21. Chromatogramy HPLC mieszaniny inkubacyjnej a) epigalokatechiny (EGC) oraz b) galusanu epigalokatechiny (EGCG) z glutationem w obecności tyrozynazy	110

Wykaz skrótów i symboli stosowanych w pracy

AAPH	generator rodników nadtlenkowych – chlorowodorek 2,2'-azynobis (2-amidinopropanu)
ABTS ^{•+}	trwały kationorodnik związku 2,2'-azynobis-3-etylobenzenotiazolino-6-sulfonianu diaminowego stosowany w teście TEAC
DPPH [•]	trwały rodnik związku 2,2-difenylo-1-pikrylhydrazylu stosowany w teście DPPH
ESR	rezonans spinu elektronowego
FRAP	ang. <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> – zdolność redukcji kompleksu żelaza (III) z tripirydylotriazyną do kompleksu żelaza (II) z tripirydylotriazyn
MDA	aldehyd <i>dimalonowy</i>
ORAC	ang. <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> – zdolność zmiatania rodników tlenowych
TBARS	ang. <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i> – metoda oznaczania stopnia hamowania peroksydacji lipidów poprzez reakcję z kwasem tiobarbiturowym
TRAP	ang. <i>Total Radical-Trapping Antioxidant Parametr</i> – całkowita zdolność wiązania wolnych rodników
TEAC	ang. <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> – troloksowy równoważnik zdolności przeciwutleniającej