

Losy roślinnych antyoksydantów w organizmie ludzkim

Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Kierownik Katedry: prof. dr hab. Kazimierz Głowniak

NATURAL ANTIOXIDANTS IN THE HUMAN BODY

SUMMARY

Oxidative stress is an imbalance in the redox status of a cell, between the production of reactive oxygen species and antioxidant defence mechanisms, leading to damage, potential mutations and ultimately the formation of cancer. Defence against oxidative stress is therefore an important factor in preventing the development of many diseases. Synthetic antioxidants such as BHT, BHA, and TBHQ have commonly been used to prevent oxidative deterioration of fats and oily foods. Nowadays, the scientists have casted some toxicological doubts on synthetic antioxidants due to their adverse side effects. Plants contain a wide variety of free radical scavenging molecules, such as fenolic acids, flavonoids, anthocyanins, carotenoids and vitamins. This antioxidants can delay or inhibit the oxidation of lipids or other molecules by inhibiting the initiation or propagation of oxidative chain reactions. A number of methods and variations have been developed and applied for the measurement of antioxidant capacity, but very often there is lack of correlation between activities determined in vivo and in vitro. Accumulating evidence indicates that flavonoids are poorly bioavailable and reach only low, micromolar concentrations in human plasma, even after the intake of large amounts of flavonoid-rich foods. In addition, most flavonoids are extensively metabolized in vivo, which can affect their antioxidant activity.

KEY WORDS: OXIDATIVE STRESS – NATURAL ANTIOXIDANTS – PHENOLIC COMPOUNDS – REACTIVE OXIGEN SPECIES

Zioła wykorzystywane są w wielu dziedzinach, w tym w medycynie i dietetyce. Są one składnikami napojów, przypraw, barwników, repelentów, substancji zapachowych i kosmetyków (1). Rośliny wytwarzają różnorodne substancje wykazujące zdolność neutralizowania wolnych rodników; należą do nich flawonoidy, antocyjany, karotenoidy, kwasy fenolowe, związki lotne, katechiny oraz witaminy. Antyoksydanty pochodzenia naturalnego mają funkcję wyłapywania tlenu singletowego, rozkładania nadtlenków, inhibicji enzymów oraz wspomaganie innych antyoksydantów (2).

Roślinne związki fenolowe, obecne w warzywach i owocach wykazują szereg aktywności biologicznych. Oprócz działania antyoksydacyjnego, mają właściwości antyproliferacyjne, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, przeciwalergiczne (3, 4). W dzisiejszych czasach naturalne antyoksydanty cieszą się bardzo dużym zainteresowaniem, ponieważ główną wadą syntetycznych

antyoksydantów, stosowanych jako środki konserwujące do żywności, są efekty uboczne ujawniające się *in vivo* (5). Badania wykazały, iż pochodne butylowe hydroksyanizolu (BHA) i hydroksytoluenu (BHT), oraz trzeciorzędowy butylohydrochinon (TBHQ) kumulują się w organizmie, co skutkuje uszkodzeniem wątroby i powstawaniem nowotworów (6).

Paradoks metabolizmu polega na tym, iż tlen jest niezbędny do życia, przy czym jest to bardzo reaktywna cząsteczka, która uszkadza żywe komórki, produkując reaktywne formy tlenu (ROS) i powodując m.in. peroksydację lipidów (7). Oksydacja zachodzi w ponad jednej czwartej przypadków znanych reakcji chemicznych katalizowanych przez enzymy w żywych komórkach. Przeważnie jest to spowodowane przeniesieniem atomów wodoru lub elektronów z jednej cząsteczki na drugą. Reakcje metaboliczne tego typu są głównym źródłem energii dla procesów życiowych (8). Stres oksydacyjny wynika z zakłócenia równowagi redoks w komórkach, pomiędzy produkcją wolnych rodników i mechanizmami obronnymi. Prowadzi to do uszkodzenia struktur komórkowych, a ostatecznie do powstawania nowotworów (9), jak również niedoborów odporności, cukrzycy, autoagresji, katarakty, zwyrodnienia starczego płamki żółtej, czy choroby Alzheimera (10).

Reaktywne formy tlenu powstają podczas oddychania komórkowego, są wyzwalane przez aktywowane leukocyty, jako odpowiedź immunologiczna oraz mają pochodzenie egzogenne (10), takie jak smog, promieniowanie UV, dieta bogata w nasycone kwasy tłuszczowe i węglowodany (11). Wolne rodniki powstające w systemach biologicznych powodują nieodwracalne zmiany i destrukcję struktur komórkowych, takich jak lipidy, białka i DNA (12). Jednakże w normalnych warunkach komórki mają systemy obrony przed działaniem wolnych rodników tlenowych, jedynie akumulacja ROS prowadzi do uszkodzenia komórek, starzenia i chorób (13). W fizjologicznych warunkach nieodwracalne uszkodzenie DNA i organelli komórkowych prowadzi do apoptozy, czyli kontrolowanej śmierci komórki (14), jednakże nieodwracalnie zmienione komórki nowotworowe unikają apoptozy i są w stanie się rozmnażać (15).

Do mechanizmów obronnych organizmu zaliczamy antyoksydanty: glutation, witaminę C, witaminę E, oraz enzymy: katalazę (CAT), dysmutazę ponadtlenkową (SOD), peroksydazę glutationową (GPx), reduktazę glutationową (GR) i S-transferazę glutationową (GST). Związki te i enzymy są zaangażowane w reakcje biochemiczne zapobiegające utlenianiu organelli komórkowych. Stres oksydacyjny indukuje prawie wszystkie rodzaje uszkodzeń DNA: modyfikację zasad DNA, wypadnięcie zasad z łańcucha DNA, rozerwanie łańcucha, połączenia krzyżowe DNA z białkami, jakkolwiek rodzaj uszkodzenia zależy od rodzaju rodnika. Tego typu uszkodzenia DNA znaleziono w genach, których dysfunkcja przyczynia się do rozwoju nowotworów. Dysmutaza ponadtlenkowa katalizuje rozkład ponadtlenków na nadtlenek wodoru i tlen. Doświadczalnie dowiedziono iż defekt SOD jest związany z kilkoma rodzajami nowotworów. Katalaza stymuluje rozkład ponadtlenku wodoru do wody i tlenu, jakkolwiek jej dokładny mechanizm działania nie jest poznany (16). Już w 1960 r. Mason i wsp. (17) donosili, iż pacjenci z nowotworami mają obniżony o 22% poziom katalazy wątrobowej.

Antyoksydant jest to substancja, która obecna w małym stężeniu w porównaniu do utlenianego substratu, w znaczący sposób opóźnia albo hamuje utlenianie substratu (18). Niektóre antyoksydanty to białka i enzymy, podczas gdy inne to małe cząsteczki. Antyoksydanty można podzielić na zapobiegające utlenieniu, zmiatające rodniki, a także odnawiające (19).

Antyoksydanty zapobiegające, jako pierwsza linia obrony, hamują powstawanie reaktywnych form tlenu i azotu (ROS/RNS); przykładowo redukują nadtlenek wodoru do wody, albo odseparowują jony metali. Antyoksydanty zmiatające usuwają ROS szybko, zanim zdążą one wejść w interakcje z ważnymi biocząsteczkami. Dysmutaza ponadtlenkowa przekształca nadtlenki do nadtlenku wodoru, natomiast karotenoidy zmiatają tlen singletowy.

Związki fenolowe stanowią drugą zapobiegającą linię obrony *in vivo*. W dalszej kolejności przeróżne enzymy naprawiają zniszczenia, oczyszczają komórki ze zbędnych metabolitów i odbudowują utracone funkcje. Istnieją też mechanizmy adaptacyjne, umożliwiające wygenerowanie danego związku o charakterze antyoksydantu w odpowiednim miejscu, czasie i stężeniu.

Antyoksydanty (IH) wyłapując wolny rodnik (X^{\cdot}) oddają atom wodoru (reakcja 1) lub elektron, po którym następuje przekazanie protonu (reakcja 2), czego wynikiem jest stabilna cząsteczka (XH) i rodnik pochodzący od antyoksydantu (I^{\cdot}). Prędkość reakcji zależy od potencjału redoks, jak również od energii

dysocjacji wiązania I-H lub/i potencjału jonizacyjnego antyoksydantu. Mechanizmy te zależą od środowiska reakcji (20). Natomiast pojemność antyoksydacyjna związków chemicznych zależy od:

1. reaktywności chemicznej, czyli stosunku wolnych rodników do ilości związanych,
2. losów rodnika powstałego z antyoksydantu,
3. interakcji z innymi antyoksydantami,
4. stężenia i ruchliwości w środowisku,
5. absorpcji, dystrybucji, magazynowania i metabolizmu w organizmie.

Jest raczej mało prawdopodobne, iż antyoksydanty naturalne zmiatają rodniki hydroksylowe, a tym bardziej alkoksylkowe *in vivo*, ponieważ rodniki te reagują głównie z lipidami, białkami, węglowodanami i DNA, które w komórkach są w o wiele większym stężeniu niż antyoksydanty (19). Tymczasem ponadtlenki i tlenek azotu są mało reaktywne w stosunku do struktur biologicznych i one właśnie mogą być zmiatane efektywnie. Antyoksydanty hydrofilowe, takie jak kwas askorbowy i kwas moczowy, reagują najpierw z rodnikami obecnymi w fazie wodnej.

Neutralizowanie wolnych rodników w błonach biologicznych i cząsteczkach lipidów zależy od takich czynników fizycznych, jak płynność środowiska i mobilność antyoksydantu, jak również jego reaktywność chemiczna. Prędkość zmiatania rodników peroksydowych przez α -tokoferol w błonach biologicznych jest mniejsza niż w homogennym środowisku (21). Przyczyną może być ograniczona ruchliwość cząsteczek α -tokoferolu spowodowana długim łańcuchem i umiejscowieniem aktywnego wodoru na powierzchni błony lipidowej. Witamina E i koenzym Q również mają długi łańcuch boczny, konieczny do wbudowania i zatrzymania antyoksydantu w błonie, aczkolwiek zmniejszający jego ruchliwość i potencjał antyoksydacyjny.

Antyoksydanty zlokalizowane są w organizmie w różnych przestrzeniach, niektóre wewnątrzkomórkowo, inne zewnątrzkomórkowo, w zależności od hydrofilności lub lipofilności środowiska. Działanie antyoksydantów jest wzajemnie powiązane. Przykładowo, witamina E neutralizując wolny rodnik sama staje się rodnikiem, który może oddziaływać z wielonienasyconymi lipidami i indukować kolejne łańcuchowe reakcje utleniania. W systemach biologicznych witamina C redukuje rodnik witaminy E zanim ten wejdzie w kolejne reakcje. Wykazano, że w przypadku nieobecności witaminy C, witamina E nasila utlenianie izolowanych cząsteczek LDL i lipidów osocza (22), jakkolwiek powstały rodnik α -tokoferolu jest dość stabilny i w normalnych warunkach reaguje jedynie z innym rodnikiem (inną cząsteczką rodnika

α -tokoferolu albo rodnikiem kwasu tłuszczowego) dając dwie stabilne cząsteczki. Witamina E, znana jako dobry lipofilowy antyoksydant, spełnia również funkcję cząsteczki sygnalizacyjnej, jako regulator ekspresji genów (23).

Wolne i zestryfikowane wielonienasycone kwasy tłuszczowe oraz cholesterol są bardzo podatne na działanie ROS. Ich utlenienie daje potencjalnie toksyczne produkty, takie jak 4-hydroksynonenal (HNE) i akroleina, które modyfikują białka i zasady DNA, co prowadzi do dysfunkcji i chorób. Do biomarkerów oksydacji zaliczamy produkty peroksydacji lipidów, oksydacyjne modyfikacje w ekspresji białek i cukrów, rozerwanie łańcucha DNA, czy produkty utlenienia zasad DNA (24).

Obrona przez stresem oksydacyjnym jest kluczowym czynnikiem w zapobieganiu wielu chorobom. Antyoksydanty przyjmowane z pożywieniem pomagają w ochronie organizmu przed stresem oksydacyjnym, jednak nie tylko neutralizując wolne rodniki, ale także dodatkowo pełniąc funkcję regulatorową dla enzymów antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych, jak również są czynnikami sygnałowymi i wpływającymi na ekspresję genów (25). Związki fenolowe odznaczają się właściwościami redoks, czyli są reduktorami w reakcjach przekazywania elektronów; są również donorami wodoru, wiążą tlen singletowy. Mogą również chelatować metale (26).

Metody opisujące pojemność antyoksydacyjną podzielono na grupy za względu na rodzaj zachodzącego oddziaływania chemicznego. Pierwsza grupa bazuje na przekazaniu elektronu (SET) i zmianie barwy zredukowanego rodnika. Zalicza się tu oznaczenie z jonami żelaza (*ferric reducing antioxidant power* – FRAP), metodę równoważników α -tokoferolu/Troloxu (*equivalent antioxidant capacity* – TEAC/TEAC) i reakcję z 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylem (DPPH).

Druga grupa opiera się na przekazywaniu atomu wodoru (HAT) i zalicza się tu metodę wyznaczającą parametr całkowitego wiązania rodników (*total radical trapping antioxidant parameter* – TRAP), badanie pojemności zmiatającej dla rodników tlenowych (*oxygen radical absorbance capacity* – ORAC) oraz badanie pojemności antyoksydacyjnej dla rodników peroksydacyjnych na podstawie chemiluminescencji (LPSC) (27).

Procedury mierzące aktywność antyoksydacyjną *in vitro* często bazują na wytworzeniu i wiązaniu wolnego rodnika o nie biologicznym charakterze. Procedury te nie mają dokładnego przełożenia na warunki *in vivo*. Zbyt wiele związków chemicznych występujących *in vivo* może mieć wpływ na przebieg reakcji redoks (28).

Badania wykazały, iż antyoksydanty wykazują różną aktywność w środowisku poszczególnych elementów komórkowych, w porównaniu do aktywności w całej komórce. Błona komórkowa stanowi barierę, która wpływa na biodostępność wewnątrzkomórkową antyoksydantów. Bariera ta może zmniejszać efekt genoprotekcyjny albo genotoksyczny antyoksydantów (29). Związki fenolowe pochodzenia naturalnego, np. flawonoidowe, są intensywnie metabolizowane *in vivo*, co powoduje zmianę ich potencjału redokсового.

Oczywisty jest również fakt, że formy związków fenolowych występujących *in vivo* nie są tymi samymi związkami, jakie izoluje się z roślin. W organizmie ludzkim, podczas transportu przez jelito cienkie, zachodzi najpierw intensywna I faza deglikozylacji, a następnie II faza metabolizmu przekształcająca aglikony w pochodne siarczanowe i O-metylowe. Dalsze przekształcenia flawonoidów zachodzą w okrężnicy, gdzie enzymy mikroflory bakteryjnej degradują flawonoidy do prostych kwasów fenolowych, które mogą się wchłaniać i podlegać dalszym przekształceniom w wątrobie (30).

Całkowita pojemność antyoksydacyjna produktów roślinnych oraz przetworzonej żywności zależy od pozytywnego i negatywnego wzajemnego synergizmu składników aktywnych o działaniu antyoksydacyjnym. Synergizm działania obserwuje się pomiędzy witaminą C i E, jak również pomiędzy witaminą E i flawan-3-olami, które regenerują witaminę E, podobnie jak witamina C. Obie te witaminy nie należą do głównych składników produkowanych przez rośliny. Witamina C w owocach stanowi mniej niż 15% pojemności antyoksydacyjnej, dlatego związki fenolowe stanowią większość pojemności antyoksydacyjnej ekstraktów roślinnych. Pojemność antyoksydacyjna poszczególnych związków fenolowych waha się w zakresie od 76,3 mg ekwiwalentu witaminy C dla kwasu chlorogenowego, do 245 mg ekwiwalentu witaminy C dla epikatechiny w przeliczeniu na 100 mg antyoksydanta. Aktywność antyoksydacyjna związków fenolowych zależy od liczby i pozycji podstawionych grup hydroksylowych i metoksydowych oraz od glikozylacji wokół szkieletu cząsteczki. Zamiana jednej grupy metoksydowej w pierścieniu B cyjanidyny powoduje zanik struktury katecholowej i spadek pojemności antyoksydacyjnej o 55,6%. Również glikozylacja aglikonów powoduje spadek aktywności antyoksydacyjnej (31).

Podsumowując, należy zwrócić uwagę na bogactwo związków naturalnych o charakterze antyoksydantów i ich wykorzystanie w suplementacji diety ludzkiej. Wiele antyoksydantów o charakterze karotenoidów, antocyjanów, katechin i flawonoidów jest dostarczanych do organizmu w warzywach i owocach. Wiele z tych

substancji wykazuje działanie ochronne dla ludzkich komórek, zmniejszając prawdopodobieństwo rozwoju nowotworów i chorób neurodegeneratywnych.

Przeprowadzono wiele badań nad aktywnością antyoksydacyjną związków pochodzenia naturalnego, jednak nadal większość z nich stanowią badania *in vitro*, nie oddające rzeczywistych procesów zachodzących w ludzkim organizmie. Z drugiej strony, pomiar pojemności antyoksydacyjnej naturalnych polifenoli w warunkach *in vivo* jest niezmiernie trudny ze względu na bogactwo procesów biochemicznych zachodzących jednocześnie w komórkach. Interpretując pomiary pojemności antyoksydacyjnej wykonywane *in vitro*, należy również pamiętać, że niektóre związki naturalne przechodzą szereg przekształceń chemicznych w przewodzie pokarmowym zanim dostaną się do krwi. Powstaje wówczas pytanie, jaki związek działa antyoksydacyjnie *in vivo* i jaka jest jego wydajność antyoksydacyjna?

Piśmiennictwo

- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B i wsp. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem* 2006; 97:654-60.
- Larson RA. The antioxidants of higher plants. *Phytochem* 1988; 4:969-78.
- Kim SJ, Kim GH. Quantification of quercetin in different parts of onion and its DPPH radical scavenging and antibacterial activity. *Food Sci Biotechnol* 2006; 15:39-43.
- Stratil P, Klejdus B, Kubao V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-evaluation of spectrophotometric methods. *J Agric Food Chem* 2006; 54:607-16.
- Ramamoorthy PK, Bono A. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *J Eng Technol* 2007; 2:70-80.
- Jiangning G, Xinchu W, Hou W i wsp. Antioxidants from a Chinese medicinal herb – *Psoralea corylifolia* L. *Food Chem* 2005; 91:287-92.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J i wsp. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:44-84.
- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Intermediary metabolism. Champe PC, Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia 2007; 148:69-82.
- Halliwell B. Oxidative stress and cancer: Have we moved forward? *Biochem J* 2007; 401:1-11.
- Temple NJ. Antioxidants and disease: more questions than answers. *Canada Nutr Res* 2000; 20:449-59.
- Céspedes M, El-Hafidi M, Pavon N i wsp. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (*Elaeocarpaceae*). *Food Chem* 2008; 107:820-29.
- Lopaczyski W, Zeisel SH. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutr Res* 2001; 21:295-307.
- Matés JM, Sánchez-Jiménez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32:157-70.
- Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends Genets* 1995; 11:101-5.
- Bold RJ, Termuhlen PM, McConkey DJ. Apoptosis, cancer, and cancer therapy. *Surg Oncol* 1997; 6:133-42.
- Asaduzzaman K, Mousumi T, Dian-Zheng Z i wsp. Antioxidant enzymes and cancer. *Chinese J Cancer Res* 2010; 22:87-92.
- Mason EE, Chin TF, Li YW i wsp. Cancer and human liver katalase. *Cancer Res* 1960; 20:1474-81.
- Halliwell B. Antioxidants: the basics – what they are and how to evaluate them. *Adv Pharm* 1997; 38:3-20.
- Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H i wsp. Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:1322S-6S.
- Wright JS, Johnson ER, DiLabio GA. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituents effects, and application to major families of antioxidants. *J Am Chem Soci* 2001; 123:1173-83.
- Niki E, Takahashi M, Komuro E. Antioxidant activity of vitamin E in liposomal membranes. *Chem Lett* 1986; 6:1573-76.
- Waldeck AR, Stocker R. Radical-initiated lipid peroxidation in low density lipoproteins: insights obtained from kinetic modeling. *Chem Res Toxicol* 1996; 9:954-64.
- Schneider C. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49:7-30.
- Niki E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Bio Med* 2010; 49:503-15.
- Tan AC, Konczak I, Ramzan I i wsp. Antioxidant and cytoprotective activities of native Australian fruit polyphenols. *Food Res Int*, doi:10.1016/j.foodres.2010.10.023.
- Javanmardia J, Stushnoff C, Lockeb E i wsp. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chem* 2003; 83:547-50.
- Müller L, Fröhlich K, Böhm V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. *Food Chem* 2011; 129:139-48.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393:561-4.
- Sze-to YT, Collins AR. Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure. *Benzene Mutation Res* 2002; 500:31-8.
- Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biol Med* 2004; 36:838-49.
- Heo HJ, Kim YJ, Chung D i wsp. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chem* 2007; 104:87-92.

otrzymano/received: 14.10.2011
zaakceptowano/accepted: 07.11.2011

Adres/address:
*mgr farm. Elwira Sieniawska
Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin
tel.: +48 506 770 158
e-mail: elwira.sieniawska@gmail.com