

Helena Puzanowska-Tarasiewicz, *Ludmiła Kuźmicka*, *Mirosław Tarasiewicz*

ANTYOKSYDANTY A REAKTYWNE FORMY TLENU

Zakład Nauk Chemicznych
Wyższej Szkoły Kosmetologii i Ochrony Zdrowia w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. *H. Puzanowska-Tarasiewicz*

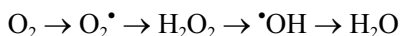
Hasła kluczowe: tlen, reaktywne formy tlenu, antyoksydanty.
Key words: oxygen, reactive oxygen species, antioxidants.

Termin „antyoksydanty” jest bardzo popularny w ostatnich czasach. Oznacza on związki odznaczające się właściwościami chroniącymi molekuły organizmu przed utlenianiem, które może spowodować zaburzenie ich struktury i funkcji. Za możliwość zajścia procesu utlenienia odpowiada obecność w środowisku tlenu – pierwiastka, bez którego nie wyobrażamy sobie życia. W organizmie człowieka tlen jest pobierany w płucach, gdzie zużywany jest w procesie oddychania. Wiąże się z hemoglobina krwinek czerwonych, następnie zostaje oddany do tkanek, gdzie bierze udział w przemianie materii. Ten życiodajny pierwiastek ma jednak drugą twarz: w każdej żywej komórce i jej otoczeniu powstają reaktywne formy tlenu (RFT), którymi oprócz wolnych rodników są także tlen singletowy i nadtlenek wodoru (1).

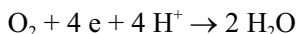
Tlen z powietrza, którym oddychamy, to cząsteczka w stanie podstawowym (tlen trypletowy, $^3\text{O}_2$). Mimo dwóch niesparowanych elektronów są one mało reaktywne – głównie dlatego, że trudno jest spotkać naraz dwa inne rodniki do dwóch jednoczesnych reakcji rekombinacji (2). Bardzo reaktywne rodniki powstają w wyniku jednoelektronowej redukcji cząsteczki tlenu – anionorodnik ponadtlenkowy $\text{O}_2^{\bullet -}$, który występuje w roztworach wodnych razem ze swoją formą proponowaną – rodnikiem wodoronadtlenkowym HO_2^{\bullet} . Kolejna redukcja prowadzi do dobrze znanego produktu nierodnikowego, ale bardzo reaktywnego nadtlenku wodoru, H_2O_2 .

Jednak najbardziej reaktywny z rodników, jakie występują w układach biologicznych to rodnik hydroksylowy $^{\bullet}\text{OH}$, stałe szybkości dla reakcji z jego udziałem są rzędu 10^{10} ($\text{dm}^3/\text{mol}\cdot\text{s}$), co oznacza, że reaguje on natychmiast z molekułami w najbliższym sąsiedztwie.

W toku normalnych procesów metabolicznych, poprzez stopniową redukcję powstaje więc sekwencja produktów:



Proces ten można sumarycznie zapisać jako:



Cztery elektrony potrzebne do tego procesu są dostarczane przez enzym – oksydazę cytochromową, który pełni rolę katalizatora. Jeśli transport elektronów i protonów uległby zatrzymaniu, nie mógłby powstać ATP (adenozynotrifosforan) będący głównym metabolitem energetycznym. Łańcuch procesów transportu elektronów,

mający miejsce w mitochondriach komórek, jest bardzo wydajny. Pod kontrolą mechanizmów enzymatycznych znajduje się 98–99% tlenu. Jednak 1–2% tej ilości nie jest przetwarzana do końca, tzn. do cząsteczki wody, a zatrzymuje się na etapie produktów pośrednich. Pewna część elektronów, „ucieka” z cyklu, redukując tlen na drodze procesu jednoelektronowego. Jest to najważniejsze źródło rodników O_2^{\bullet} w większości komórek aerobowych. Stężenie następnego produktu w łańcuchu, czyli nadtlenku wodoru jest 100–1000 razy mniejsze. Poziom H_2O_2 jest różny w zależności od rodzaju tkanki (najwięcej jest go np. w mózgu, wątrobie i mięśni sercowym). Zarówno obecność rodnika O_2^{\bullet} , jak i cząsteczki H_2O_2 jest w komórce naturalnym zjawiskiem fizjologicznym.

Groźniejszym jest rodnik $\bullet OH$, powstający z nadtlenku wodoru w obecności jonów żelaza(II), tzw. reakcji Fentona oraz jonów żelaza i miedzi w reakcji *Habera-Weissa* (2). Gdy celem ataku rodnika $\bullet OH$ jest mitochondrialny DNA (jak wiadomo ma postać spirali, z dwóch nici polinukleotydów), to następuje pęknięcie łańcucha, tworzenie innych wiązań oraz modyfikacje zasad tworzących nić. Ilość uszkodzeń DNA w komórce człowieka ocenia się na 10 tysięcy (czyli 10^4) dziennie. Ważną rolę pełnią liczne enzymy „naprawcze”. Najważniejsze są oczywiście enzymy naprawiające DNA (nukleazy, glikolazy, ligazy, polimerazy), które nieustannie „wycinają” utlenione fragmenty, usuwają addukty DNA – białko tak, że DNA izolowany z tkanki zdrowego człowieka właściwie nie ma uszkodzeń oksydacyjnych.

Jak podano w pracy (2), tlen jako cząsteczka, może występować w stanie singletowym i trypletowym. Tlen singletowy, znacznie bardziej reaktywny niż tlen trypletowy, powstający w wyniku zaabsorbowania kwantu promieniowania nadfioletowego, może oddziaływać z cząsteczkami organicznymi na dwa sposoby: przekazywać im energię wzbudzenia przechodząc w stan trypletowy lub wchodzić w reakcje chemiczne, np. z resztami aminokwasowymi białek – histydyny, metioniny, tryptofanu, tyrozyny, cysteiny (3). Reagować może także ze składnikami kwasów nukleinowych oraz atakować wszystkie reszty purynowe i pirymidynowe.

Duża akumulacja powyżej omówionych RFT w organizmie w wyniku zaburzonego metabolizmu komórkowego oraz działania czynników zewnętrznych może prowadzić do zachwiania równowagi pomiędzy reakcjami wolnorodnikowymi i przeciwutleniającymi, a w dalszej kolejności wywołać uszkodzenia struktur komórkowych. Zjawisko to nazywa się stresem oksydacyjnym. Do chorób związanych ze stresem oksydacyjnym należą m.in. miażdżycy, cukrzyca, nowotwory czy choroby układu nerwowego. W obronie przed RFT organizm wykorzystuje kilka systemów enzymatycznych oraz antyoksydanty endogenne (1).

Wolne rodniki codziennie atakują nasz organizm. Antyoksydanty go bronią, np. witamina C. Ale ciągle mamy jej za mało, bo ludzki organizm nie wytwarza witaminy C. Działanie przeciwrodnikowe witaminy C jest niezwykle efektywne, ponieważ jest prawie w całości regenerowana. Proces ten jest w pełni wykorzystywany przy wspólnym działaniu przeciwrodnikowym mieszaniny C z tokoferolami (witaminą E). W obecności witaminy C dochodzi do swoistego wzmocnienia działania (synergizmu) pomiędzy obydwoma witaminami. Witamina E, po wychwyceniu wolnego rodnika, nie ulega rozpadowi, lecz pod działaniem witaminy C zostaje całkowicie zregenerowana. Właściwości fizykochemiczne i przeciwrodnikowe witaminy C i E zostały opisane w pracach (4, 5).

FLAWONOIDY I ANTOCYJANY

Antyoksydanty są właściwie w każdej roślinie, tyle że w niektórych roślinach jest ich więcej, w innych mniej i każdy działa nieco inaczej. Na przykład jedna z grup polifenoli – flawonoidy – zawiera ok. pięć tysięcy substancji zwalczających wolne rodniki. Polifenole to grupa metabolitów wtórnych roślin, wśród których najważniejszymi z punktu widzenia aktywności przeciwutleniającej są flawonoidy i spokrewnione z nimi antocyjany. To klasa związków posiadających w cząsteczce jeden lub więcej pierścieni aromatycznych, zawierających od jednej do kilkudziesięciu grup hydroksylowych (fenolowych). Większość z nich występuje w roślinach takich jak: arnika górską, rumianek, tarnina, lukrecja, miłorząb japoński, chmiel, herbata, winorośl i wiele innych oraz w diecie człowieka. Na przykład w zielonej i czarnej herbacie oraz czerwonym winie znajdują się związki, takie jak kwercetyna, mirycetyna, epikatechiny, antocyjany. Do najważniejszych kierunków działań w/w związków w organizmie zalicza się wychwytywanie wolnych rodników, ochrona przed utlenianiem lipidów, działanie przeciwzapalne, przeciwmutagenne (6).

Do bardzo ważnych cech polifenoli zalicza się także ich zdolność do stabilizowania witaminy C (chronią ją przed utlenianiem). Dzięki tej właściwości wywierają one korzystny wpływ na syntezę kolagenu. Polifenole są również doskonałym, naturalnym filtrem promieniochronnym zwłaszcza wobec promieni UVA uszkadzających skórę właściwą (7).

Reaktywne formy tlenu biorą udział w procesie powstawania nowotworów skóry pod wpływem promieniowania UV. Jak powszechnie wiadomo, wolne rodniki wykazują dużą reaktywność chemiczną, mogą naszej skórze wyrządzić dużo szkód. Reakcje wolnorodnikowe przebiegają łańcuchowo i wieloetapowo. Dzięki swoim właściwościom polifenole mogą neutralizować wolne rodniki różnego typu, poczynając od rodników hydroksylowych, anionorodnika ponadtlenkowego, a na rodnikach lipidowych kończąc. W skład naskórka ludzkiego wchodzi struktury lipidowe, które łatwo ulegają procesowi utleniania rodnikowego. Neutralizując wolne rodniki, polifenole chronią lipidy cementu komórkowego przed utlenianiem. Proces wolnorodnikowego utleniania lipidów naskórka może być przerwany przez cząsteczkę polifenolu już na etapie inicjacji. Jak wiadomo, w warstwie rogowej naskórka (stratum corneum) polifenole działają przede wszystkim przeciwrodnikowo. W głębszych partiach naskórka mogą one wpływać na aktywność enzymów, aż wreszcie najgłębiej w skórze właściwej wpływają na stan naczyń krwionośnych i stymulują mikrażenie skórne (7).

Badania przeprowadzone przez *Hernandez'a* i współpr. (8) sugerują, że regularne picie herbaty, szczególnie zielonej chroni organizm przed nowotworami i rozwojem choroby wieńcowej serca. Katechiny występujące w herbacie są potencjalnymi antyoksydantami i wazodilatatorami (9). Hamują one enzymy prooksydacyjne (10) oraz są inhibitorami receptorów czynników wzrostowych związanych z rozwojem różnych typów raka oraz miażdżycy naczyń krwionośnych.

W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania izoflawonoidów – związków zaliczanych do polifenoli (np. genisteiny) występujących w soi jako substancji o wybitnym działaniu wazoprotekcyjnym w schorzeniach serca i naczyń (11). Genisteina z soi hamuje także rozwój komórek nowotworowych sutka, prostaty, jelita grubego (12).

Najliczniejszą grupę polifenoli stanowią flawonoidy o charakterze barwników – antocyjany. Występują one przede wszystkim w owocach jagodowych, nadających owocom atrakcyjne kolory. Największą zawartość antocyjanów i przy tym najwyższą aktywność przeciwutleniającą wykazują owoce jagodowe, jak: żurawina, czarna jagoda, malina, truskawka oraz winogrona i jagody bzu czarnego oraz borówki czarnej. Spośród 20 znanych antycyjanidyn tylko sześć występuje w owocach jadalnych, np. cyjanidyna. Związki te wykazują silne właściwości przeciwutleniające *in vitro* wyższe niż witaminy przeciwutleniające i karetonoidy. Hamują skutecznie utlenianie lipidów oraz eliminują aktywne formy tlenu i azotu. Mogą wiązać kationy metali stymulujące procesy wolnorodnikowe, jak również wykazują zdolność inhibicji wielu enzymów przyczyniających się do powstania RFT (14). Ze względu na surowce bogate w ciemnofioletowe barwniki zaliczane są do środków odtruwających organizm, pożądanych szczególnie w żywności ludzi żyjących w skażonym środowisku (usuwają z organizmu toksyczne metale ciężkie, np. ołów).

W świecie roślin, np. w roślinach z rodzaju *Forsytha* występuje rutozyd – posiadający zdolność wychwytywania wolnych rodników (14). Dzięki właściwościom anty wolnorodnikowym (chroni m.in. erytrocyty przed ich oksydacyjną hemolizą), przeciwzapalnym i antyagregacyjnym rutozyd może zapobiegać nie tylko zmianom miażdżycowym w naczyniach, ale także przyczyniać się do przywrócenia normalnego funkcjonowania komórek śródbłonna objętych zmianami miażdżycowymi.

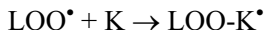
W podsumowaniu należy stwierdzić, że polifenole roślinne wykazują szczególnie dużą skuteczność przeciwrodnikową i przeciwutleniającą. Działają także bakteriobójczo, bakteriostatycznie. Opóźniają procesy starzenia się skóry, pochłaniają promieniowanie UVA i UVB wpływając pozytywnie na mikrokążenie skórne i likwidują przebarwienia skóry.

KAROTENOIDY

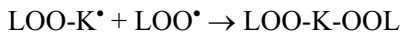
Karotenoidy należą do izoprenoidów i obejmują kilkaset związków, z których ok. 50 występuje w żywności. Dotychczas opisano ponad 600 naturalnych karotenoidów. Jest to grupa rozpuszczalnych w tłuszczach (lipofilowych), pomarańczowo-czerwonych barwników typowych dla m.in. pomidorów i marchwi. Karotenoidy są złożonymi polienami, które absorbują światło w zakresie 400–500 nm. Najbardziej rozpowszechniony w przyrodzie jest β -karoten – żółty barwnik roślinny o wzorze sumarycznym $C_{40}H_{56}$. β -karoten zawiera dwa pierścienie β -jononu połączone łańcuchem, który jest tetrametrem izoprenu. Podobną budowę wykazuje likopen – występujący w pomidorach. Charakterystycznymi elementami budowy β -karotenu i likopenu jest chromofor składający się z układu wielu sprzężonych wiązań podwójnych. Jako związki polienowe, wszystkie karotenoidy są antyoksydantami aktywnymi *in vitro* i *in vivo*. Zawarte m.in. w pomidorze α -karoten i β -karoten wykazują aktywność witaminy A. Najsilniejszym przeciwutleniaczem wśród karotenoidów jest likopen, znany także pod nazwą $\gamma\gamma$ -karotenu.

Właściwości przeciwutleniające karotenoidów wiążą się głównie z efektywnym wygaszaniem tlenu singletowego. Przykładowo β -karoten reaguje z z organicznymi wolnymi rodnikami powstającymi w procesie peroksydacji lipidów. W wyniku

reakcji addycji rodnika nadtlenu lipidu (LOO^{\bullet}) do β -karotenu (K) powstaje wolny rodnik, w którym niesparowany elektron zlokalizowany jest na atomie węgla (2):



Następnie przebiega reakcja:



w wyniku której powstaje addukt karotenowy, który może reagować z następnymi rodnikami, tworząc wielokrotne addukty:



Karotenoidy mogą redukować rodniki tiolowe (RS^{\bullet}), sulfonolowe (RSOO^{\bullet}) oraz ditlenek azotu (NO_2^{\bullet}) oraz reagować z nadtleniem wodoru, H_2O_2 . Związki te, obok tokoferoli i ubihydrochinonu, występują także jako hydrofobowe antyoksydanty w osoczu krwi, które jest ubogie w enzymy antyoksydacyjne (2).

BETALAINY

Obecnie zidentyfikowano około 50 barwników betalainowych, różniących się strukturą przestrzenną i podstawnikami glikozydowymi. Przykładowo w buraku czerwonym występują m.in. betanina, betacyjanina, betanidyna, izobetanina, prebetanina, izoprebetanina i inne (13). Występują w nim również barwniki żółte betaksantyny, w których skład wchodzi kwas betalaminowy skondensowany z jednym z aminokwasów – glutaminą lub glutaminianem. Barwniki i kwasy fenolowe są koncentrowane głównie w skórce buraka, następnie w koronie rośliny, a najmniej zawiera ich miąższ.

Betalainy charakteryzują się trwałą barwą w zakresie pH 4–6, są mało stabilne termicznie, gdyż podczas ogrzewania rozpadają się na cukier i kwas betalaminowy. Proces degradacji betalain podczas ogrzewania i składowania przyspiesza światło, tlen i czynniki katalizujące procesy oksydacyjne, m.in. jony żelaza, miedzi i oksydazy.

Betalainy odgrywają istotną rolę w redukcji rodników – mogą zatrzymać łańcuch reakcji rodnikowych. Dzięki redukcji rodników nadtlenkowych i alkoksyłowych ochraniają lipidy, nie dopuszczając do powstania produktów peroksydacji lipidów, które często wykazują właściwości rakotwórcze (2, 13).

INNE ANTYOKSYDANTY

Silne właściwości antyutleniające wykazuje melatonina (15). Występuje ona w różnych częściach roślin: w korzeniach, liściach, owocach, kwiatach oraz nasionach. Chroni ona tkanki roślinne przed stresem oksydacyjnym wywołanym stresami środowiskowymi, takimi, jak: zmiany stężenia ozonu, wysoka i niska temperatura, UV, zanieczyszczenia. Działając jako antyoksydant, usuwa reaktywne formy tlenu skuteczniej niż witamina E oraz glutation. Reguluje też aktywność enzymów systemu antyoksydacyjnego, szczególnie peroksydazy i reduktazy glutationowej, a także

katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej. U ssaków jest wytwarzana głównie w szyszynce. U zwierząt jest hormonem uczestniczącym w regulacji dobowego bądź okołodobowego rytmu biologicznego (jest syntezowana w nocy, na świetle zaś jej ilość obniża się).

Po wielu badaniach naukowcy odkryli w liściach roślin, korze drzew iglastych, ziarnach kukurydzy i zbóż kwas ferulowy. Chroni on rośliny przed działaniem wolnych rodników i promieniowania słonecznego. Na uwagę zasługują także zawarte w algach polifenole, posiadające właściwości antyoksydacyjne i antyrodnikowe. Polifenole to nie tylko antyoksydanty, biorą one też udział w procesie przekazywania informacji w komórkach, gdyż wpływają na aktywność enzymów – kinaz białkowych. Inne antyoksydanty i systemy antyoksydacyjne zostały opisane w monografii „Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka” (16).

Organizm ludzki, podobnie jak inne żywe organizmy potrzebuje tlenu. Bez tlenu człowiek może przeżyć jedynie kilka minut. Mało kto zdaje sobie jednak sprawę, że nadmiar tlenu szkodzi. Zwłaszcza nadmiar reaktywnych form tlenu (RFT) może mieć groźne konsekwencje. Istotną rolę w ochronie organizmu przed negatywnymi skutkami oddziaływania RFT odgrywają antyoksydanty, m.in. witaminy C, E oraz polifenole, karotenoidy.

H. Puzanowska-Tarasiewicz, L. Kuźmicka, M. Tarasiewicz

ANTIOXIDANTS AND REACTIVE OXYGEN SPECIES

PIŚMIENNICTWO

1. Puzanowska-Tarasiewicz H., Starczewska B., Kuźmicka L.: Reaktywne formy tlenu. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2008; 41: 385-398. – 2. Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2003. – 3. Fotte C.S., Ching T.Y., Geller G.G.: Chemistry of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.*, 1974; 20: 511-513. – 4. Puzanowska-Tarasiewicz H., Fizykochemiczne właściwości witaminy C. *Farm. Polska*, 1983; 39: 267-275. – 5. Aret J., Pytkowska K.: Ochrona skóry przed egzogennymi czynnikami starzeniowymi. *Wiad. Polskiego Towarzystwa Kosmetologicznego*, 2003; 6: 2-6. – 6. Zern T.L., Fernandez M.L.: Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J. Nutr.* 2005; 135: 2291-2294. – 7. Potargowicz E., Szerszenowicz E.: Polifenole roślinne w kosmetyce. *Pol. J. Cosmetol.* 2006; 9: 70-76. – 8. Hernandez Figueroa T.T., Rodriguez-Rodriguez E., Sanchez-Muniz F.J.: The green tea, a good choice for cardiovascular disease prevention? *Arch. Litinoam Nutr.*, 2004; 54: 380-394. – 9. Yang Y.C., Lu F.H., Wu J.S., Chang C.J.: The protective effect of habitual tea consumption on hypertension. *Arch. Intern. Med.*, 2004; 164: 1534-1540. – 10. Łuczaj W., Skrzydlewska E.: Antioxidative properties of black tea. *Prev. Med.*, 2005; 40: 900-918.
11. Wietrzyk J., Boratyński J., Gryniewicz G., Ryczyńska C., Opolski A., Antyangiogenic and antitumour effects *in vivo* of genistein applied alone or combined with cyclophosphamide. *Anticancer Res.*, 2001; 21: 3893-3896. – 12. Tamimi R.M., Lagiou P., Adami H.O. i współpr.: Prospects for chemoprevention of cancer. *J. Intern. Med.*, 2002; 251: 286-300. – 13. Śmiechowaska A., Kusznierewicz B., Bartoszek A., Namieśnik J.: Badania właściwości przeciwutleniających związków pochodzących z najczęściej spożywanych owoców i warzyw. *Analityka*, 2008; 4: 26-30. – 14. Tokar M., Klimek B.: Rośliny z rodzaju *Forsythia* jako źródło naturalnych antyoksydantów i fitoestrogenów. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2007; 40: 45-55. – 15. Janas K.M., Szafrńska K., Pasmak M.: Melatonina w roślinach. *Kosmos*, 2005; 54: 267-268. – 16. Ball S.: Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka. *Medyk*, Warszawa 2001.