

Małgorzata Nogala-Kalucka, Aleksander Siger

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Biochemii i Analizy Żywności

## Tokochromanole – bioaktywne związki roślin oleistych. Od biosyntezy do biomarkerów.

### Tocochromanols – bioactive compounds of oilseeds. From biosynthesis to biomarkers.

Słowa kluczowe: tokoferole, tokotrienole, plastochromanol-8, rzepak, biosynteza, biomarkery

Tokochromanole należą do grupy rozpuszczalnych w tłuszczach przeciwutleniaczy obecnych w plastydach. Rośliny oleiste są szczególnie bogate w te związki, średnio zawierają około 10-krotnie więcej tokochromanoli niż inne rośliny. Oprócz wielu funkcji jakie pełnią w organizmach fotosyntetyzujących, związki te należą także do podstawowych składników diety ludzi i zwierząt. W pracy opisano proces biosyntezy tokoferoli, tokotrienoli oraz plastochromanolu-8 na podstawie badań anatomicznych części roślin na przykładzie rzepaku (*Brassica napus* L.). W systematyczny sposób opisano także właściwości tej grupy związków jakie pełnią w organizmie człowieka, począwszy od ich zdolności przeciwutleniających do fizjologicznych przemian, w których powstaje szereg biomarkerów obrazujących przebieg określonych procesów biologicznych.

Key words: tocopherols, tocotrienols, plastochromanol-8, rapeseed, biosynthesis, biomarkers

Tocochromanols belong to a group of lipid-soluble antioxidants present in plastids. Oilseeds are particularly rich in tocochromanols with their average concentration ten-fold higher than in other plants. In addition to their numerous functional roles in photosynthetic organisms, these compounds are also essential components of animal and human diet. This paper describes the process of biosynthesis of tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 through the examination of anatomical parts of the plant taking the rapeseed (*Brassica napus* L.) as an example. In a systematic way, it also describes the characteristics of this group of compounds acting in the human body, ranging from antioxidant properties to the physiological changes generating a series of biomarkers depicting the course of certain biological processes.

## Wstęp

Składniki żywności określane jako bioaktywne charakteryzują się udokumentowanymi korzyściami zdrowotnymi, wykraczającymi poza zwykłe efekty żywieniowe, a ich działanie wywołuje selektywny i pozytywny skutek w odniesieniu do określonych funkcji organizmu człowieka. Związki te zapobiegają m.in. rozwojowi chorób cywilizacyjnych, spowalniają procesy degeneracyjne, starzenie się organizmu, mogą także zwiększać wydolność fizyczną i umysłową oraz łagodzić skutki stresu.

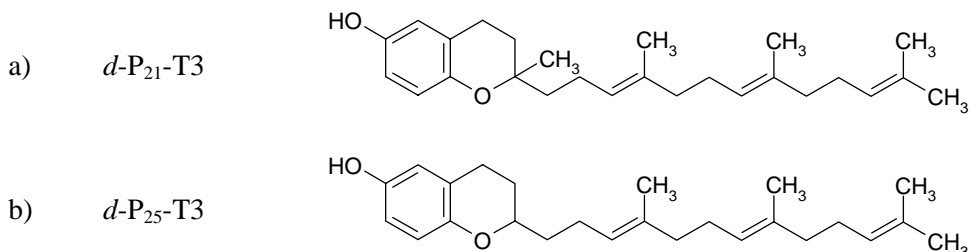
Do najważniejszych związków o właściwościach substancji bioaktywnych w nasionach roślin oleistych zaliczamy:

- tokochromanole (tokoferole, tokotrienole, plastochromanol-8),
- polifenole (kwasy fenolowe, flawonoidy, izoflawony i in.),
- izoprenoidy (terpeny, fitosterole, karotenoidy).

### Budowa i właściwości tokochromanoli

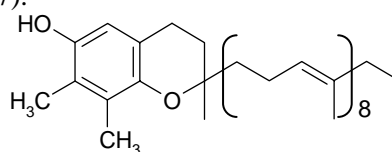
Termin „tokoferol” został wprowadzony po raz pierwszy przez Evansa i Bishopa w 1922 roku, a w 1924 roku Sure określił tę substancję jako witaminę E (Dörmann 2007). Tokochromanole to grupa związków syntetyzowana tylko przez rośliny i mikroorganizmy fotosyntetyzujące. Nazwa ta dotyczy 10 nasyconych substancji: czterech tokoferoli (T) i sześciu tokotrienoli (T3) oraz pochodnych wykazujących aktywność przypisywaną witaminie E (Nogala-Kalucka 2007). Wszystkie związki witaminy-E aktywne są amfipatycznymi molekułami zbudowanymi z układu pierścieniowego 6-chromanolu (6-hydroksychromanolu), składającego się z dwóch skondensowanych pierścieni: benzenowego i tetrahydropiranowego oraz izoprenowego łańcucha bocznego przyłączonego w pozycji 2 (Hofius i Sonnwald 2003, Eitenmiller i Lee 2004). Stopień nasycenia łańcucha bocznego decyduje o podziale tokochromanoli na tokoferole (nasycony łańcuch boczny) i tokotrienole (nienasycony łańcuch boczny – podwójne wiązania w pozycjach 3', 7', 11') (Ajjaw i Shintani 2004). Tokoferole posiadają 3 centra chiralne w pozycji 2 pierścienia oraz 4' i 8' łańcucha bocznego, natomiast tokotrienole tylko jedno przy C-2 (Lodge 2005). Każda z dwóch grup tokochromanoli ma 4 labilne homologi  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -, różniące się między sobą położeniem grupy metylowej w pierścieniu aromatycznym (Setiadi i Chass 2003).

W grupie tokotrienoli zostały zidentyfikowane kolejne dwa homologi występujące w otrębach ryżowych. Są to desmetylo-tokotrienol ( $d$ -P<sub>21</sub>-T3) i didesmetylo-tokotrienol ( $d$ -P<sub>25</sub>-T3) (rys. 1), które od pozostałych tokotrienoli różni brak grup metylowych w pierścieniu benzenowym (Quershi i in. 2000).



Rys. 1. Wzory strukturalne a) desmetylo-tokotrienolu i b) didesmetylo-tokotrienolu  
*The structural formulas a) desmethyl-tocotrienol and b) didesmethyl-tocotrienol*

Związkiem podobnym w strukturze do tokotrienoli jest plastochromanol-8 (PC-8), który jest pochodną  $\gamma$ -T3 i różni się od niego dłuższym łańcuchem bocznym (rys. 2). Występuje on w nasionach rzepaku, rzepiku, gorczycy, lnu, a w największych ilościach w oleju lnianym i rzepakowym (Olejnik i in. 1997). Tokochromanole w warunkach beztlenowych są odporne na działanie zasad, kwasów i wysokiej temperatury. Natomiast w warunkach tlenowych łatwo ulegają rozpadowi pod wpływem światła, tlenu oraz jonów niektórych metali (np.  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ) (Nogala-Kałucka 2007).



Rys. 2. Wzór strukturalny plastochromanolu-8 — *The structural formula plastochromanol-8*

Tokochromanole zidentyfikowano w wielu roślinnych plastydach: amyloplastach nasion i bulw, chloroplastach tkanek fotosyntetyzujących, leukoplastach płatków oraz chromoplastach owoców (Kruk i Strzałka 1995). Stwierdzono ich obecność również w mitochondriach, cytozolu, wakuolach oraz błonach mikrosomalnych (Janiszowska 1986, Munne-Bosch i Alegre 2002). Tokoferole są obecne we wszystkich częściach anatomicznych roślin. Istnieje jednak duże zróżnicowanie jeśli chodzi o całkowitą zawartość tokoferoli, jak i udział poszczególnych homologów. Wykazano, że w surowcach i produktach roślinnych w największej ilości są obecne dwa homologi tokoferolu:  $\alpha$ - oraz  $\gamma$ -T. W większości tkanek przeważa  $\alpha$ -T, z wyjątkiem nasion, gdzie udział homologu  $\gamma$ -T jest zwykle największy. Natomiast tokotrienole występują w znacznie mniejszej ilości, głównie w nasionach — łusce i kielkach. Spośród tokotrienoli przeważa obecność homologów:  $\alpha$ - i  $\gamma$ -T3, których głównym naturalnym źródłem jest olej palmowy (Bramley i in. 2000, Eitenmiller i Lee 2004, Szymańska i Kruk 2007).

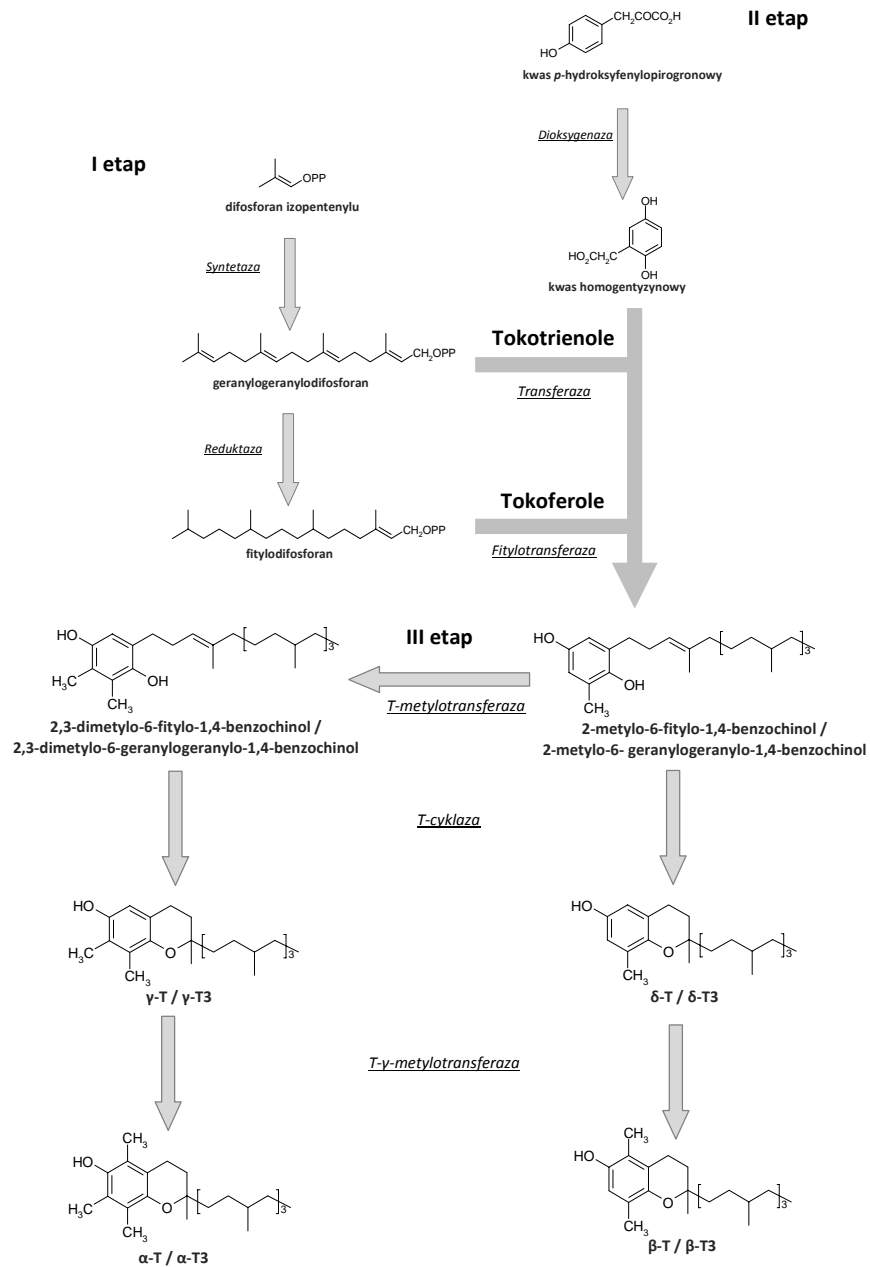
Ze względu na to, że poszczególne homologi tokochromanoli wykazują różną aktywność biologiczną, zawartość witaminy E w produktach spożywczych podaje się w przeliczeniu na ekwiwalent  $\alpha$ -T (mg TE) (Eitenmiller i Lee 2004). Najwartościowsze w związki witamino-E aktywne są nasiona roślin oleistych, do których zalicza się m.in. rzepak, soję, słonecznik oraz owoce palmy czerwonej. Na podstawie kilkuletnich obserwacji prowadzonych w wielu krajach stwierdzono, że zawartość tokochromanoli jest zależna przede wszystkim od warunków klimatyczno-glebowych uprawy roślin i dojrzałości zbieranych nasion (Abidi i in. 1999, Dolde i in. 1999, Nogala-Kałucka 2007).

## Biosynteza tokochromanoli

---

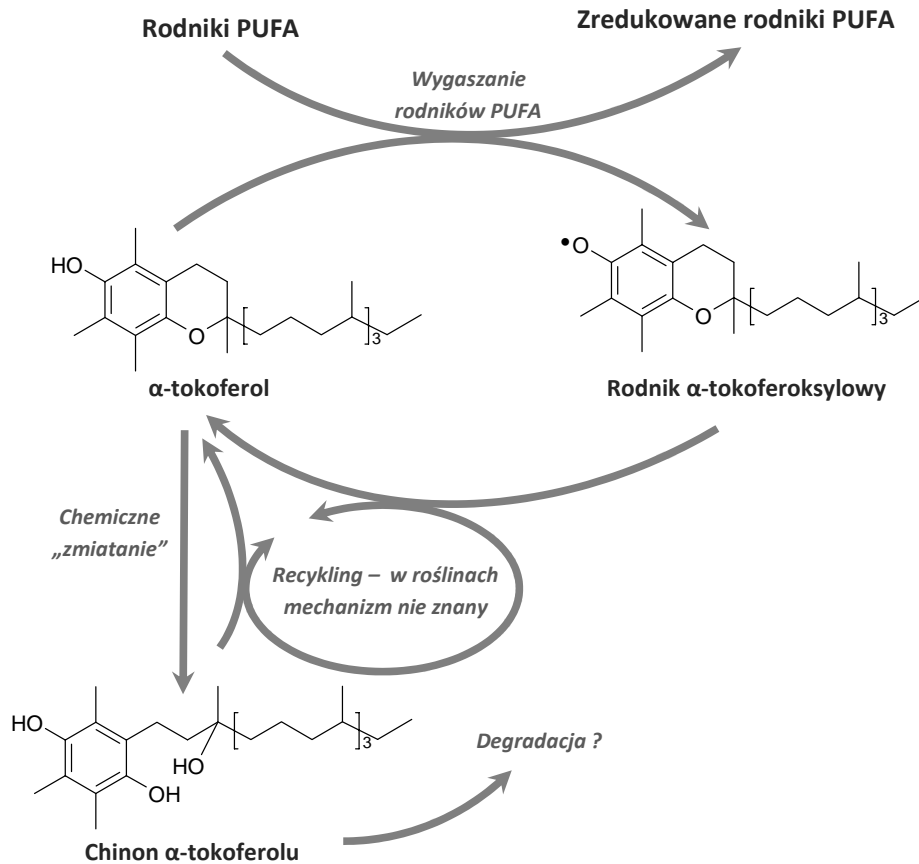
Badania nad biosyntezą tokoferoli wykazały, że głównym miejscem ich syntezy są plastydy (DellaPenna 2005), a ich pochodzenie jest heterogenne, gdyż pierścień aromatyczny 1,4-benzochinolu i dwudziestowęglowy łańcuch prenylowy powstają oddzielnie na różnych szlakach metabolicznych (Janiszowska 1986, Herbers 2003). Cykl metaboliczny tworzenia się tokochromanoli można podzielić na cztery etapy przebiegające z udziałem sześciu reakcji enzymatycznych (Bramley i in. 2000). Niezbędne enzymy uczestniczące w biosyntezie tokochromanoli zlokalizowane są w błonach komórkowych plastydów. W analogiczny sposób przebiega powstawanie tokotrienoli z 2-metylo-6-geranylogeranylobenzochinolu i 2,3-dimetylo-5-geranylogeranylobenzochinolu (MGGBQ i DMGGBQ) (rys. 3) (Eitenmiller i Lee 2004).

Biosynteza plastochromanolu-8 przebiega podobnie jak u tokoferoli w czterech etapach (rys. 4). W odrębnych reakcjach powstaje kwas homogentyzynowy (HGA) oraz difosforan solanesylu (SDP) (łańcuch boczny), którego prekursorem jest difosforan izopentenylu (IPP). Kolejnym etapem jest kondensacja HGA i SDP w cząsteczkę 2-metylo-6-solanesylo-1,4-benzohydrochinolu przy udziale solanesylo-transferazy. Następnie w wyniku reakcji enzymatycznych: metylacji i cyklizacji tworzy się kolejno plastochinon-9 (PQ-9) oraz plastochromanol-8 (PC-8) (Kumar i in. 2005, DellaPenna 2005a, Dörmann 2007).



Rys. 3. Schemat biosyntezy tokoferoli i tokotrienoli (na podstawie Eitenmiller i Lee 2004, Nogala-Kałużka 2007) — *Scheme of biosynthesis of tocopherols and tocotrienols (based on Eitenmiller and Lee 2004, Nogala-Kałużka 2007)*





Rys. 5. Wygaszanie rodników polienowych kwasów tłuszczowych i reaktywnych form tlenu przez tokoferole (na podstawie Munne-Bosch i Falk 2004) — *Scavenging of polyunsaturated fatty acids radical and reactive oxygen species by tocopherols (based on Munne-Bosch and Falk 2004)*

## Wegetacja rzepaku a zawartość tokochromanoli w anatomicznych częściach rośliny

W czasie rozwoju rzepaku można wyróżnić sześć głównych faz:

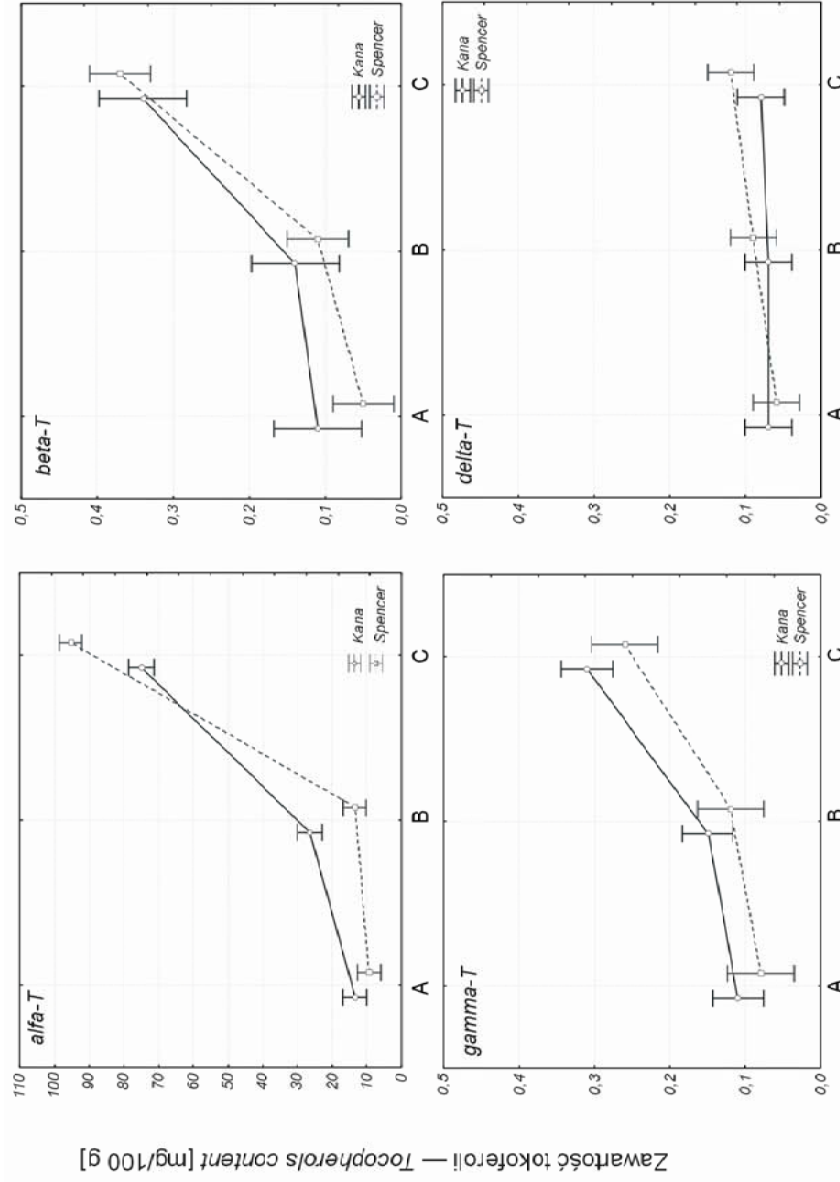
- kiełkowanie i wschody, które od siewu do czasu uformowania pierwszego liścia trwają zwykle 10–15 dni,

- formowanie rozety, które u form ozimych do czasu zahamowania wegetacji jesiennej trwa najczęściej 50–60 dni,
- formowanie łodygi, trwające po wiosennym ruszeniu wegetacji 20–25 dni,
- pąkowanie (15–25 dni),
- kwitnienie (20–30 dni),
- formowanie nasion i dojrzewanie (35–40 dni) (Bartkowiak-Broda i in. 2005).

W czasie formowania poszczególnych faz rozwojowych wyróżnia się mniejsze jednostki fenologiczne, nazywane umownie stadiami rozwojowymi (Bartkowiak-Broda i in. 2005). Długość całego okresu wegetacyjnego u ozimych form rzepaku zawiera się najczęściej w przedziale 315–320 dni. Możliwość sterowania procesem biosyntezy przeciwutleniaczy w roślinach jest nadal przedmiotem wielu badań naukowych (Hofius i Sonnewald 2003, Munne-Bosch i Falk 2004). Biosyntezę natywnych przeciwutleniaczy badano w dwóch odmianach populacyjnych rzepaku podwójnie ulepszanego: Kana i Spencer. W czasie wegetacji roślin pobierano ich części anatomiczne do analizy (liście, zawiązki kwiatów, kwiaty oraz łuszczyzny). Próby pobierano losowo na całej powierzchni pól doświadczalnych Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Analizowany materiał pochodził ze zbioru w 2003 roku. Po każdym zbiorze zielone części roślin zamrażano, a potem poddawano liofilizacji. Następnie próby po rozdrobnieniu zmydlano i przeprowadzano ekstrakcję substancji niezmydlających się zgodnie z metodą opisaną przez Nogala-Kałucką i in. (2006). Analizę zawartości tokochochromanoli przeprowadzono przy użyciu HPLC z detekcją fluorymetryczną.

Na rysunku 6a przedstawiono zawartość tokoferoli w zielonych częściach rośliny – liście, które zebrano w czasie formowania kwiatów, w trakcie kwitnienia oraz w czasie formowania łuszczyzn. W badanym materiale *Brassica napus* oznaczono cztery homology tokoferoli ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -T) oraz PC-8. W liściach rzepaku obserwowano wzrost zawartości tokoferoli podczas wegetacji rośliny (rys. 6a). W zielonych częściach (liściach) dominował homolog  $\alpha$ -T, którego zawartość wzrosła z 13,5 do 75,9 mg/100 g s.m. (odmiana Kana) oraz z 9,3 do 95,3 mg/100 g s.m. (odmiana Spencer). Zawartość pozostałych homologów nie przekroczyła 1 mg/100 g s.m. Nogala-Kałucka i in. (2002) badając zmiany zawartości tokoferoli podczas wzrostu rzepaku jarego stwierdzili większą ilość homologu  $\gamma$ -T w liściach rzepaku jarego (homolog  $\gamma$ -T stanowił 40,6% sumy tokoferoli, natomiast  $\alpha$ -T 34,4%). Według Hofius i Sonnewald (2003) w częściach zielonych roślin występuje głównie  $\alpha$ -T, który lepiej chroni aparat fotosyntetyzujący przed reaktywnymi formami tlenu i wolnymi rodnikami. Zawartość tokoferoli w zawiązkach kwiatowych, kwiatach, łuszczyznach i w nasionach przedstawiono na rysunku 6b.

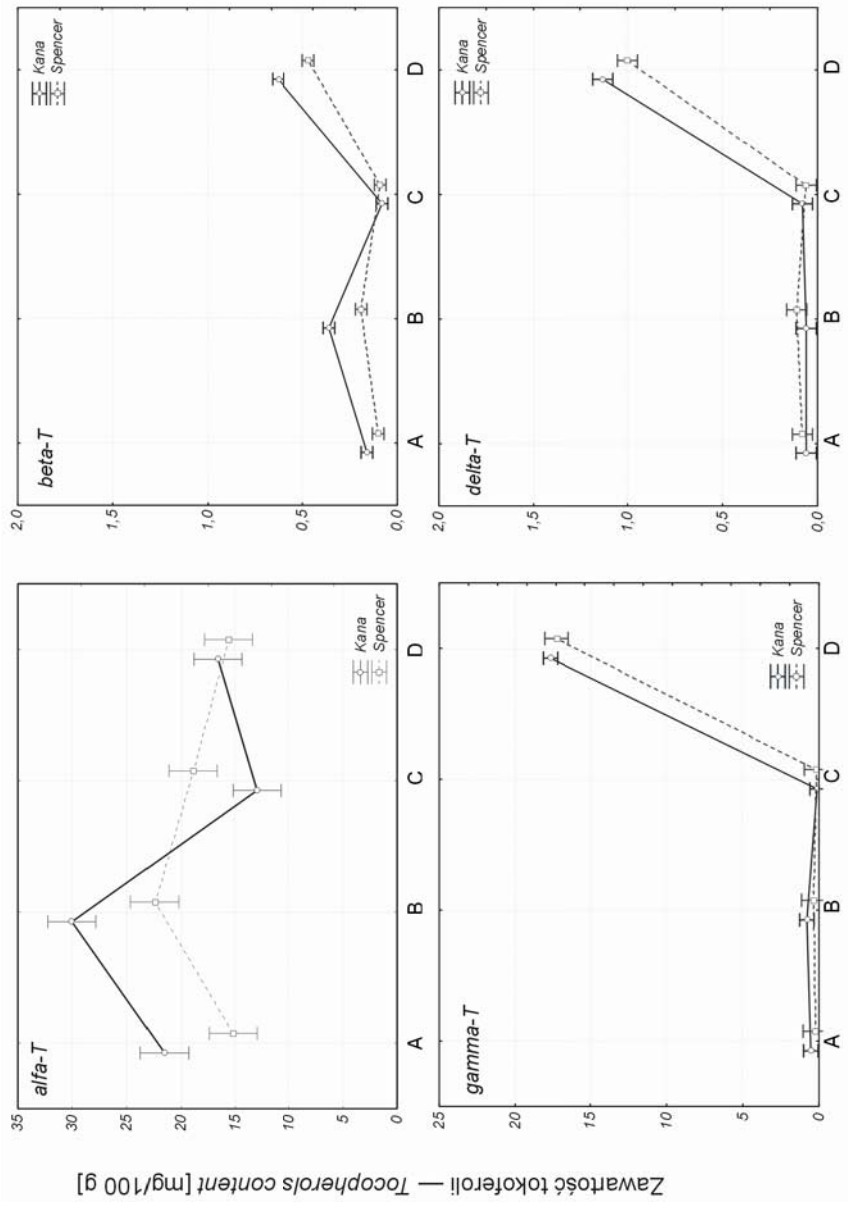




A — liście w czasie formowania kwiatów — leaves during the formation of flowers B — liście w czasie kwitnienia — leaves at flowering

C — liście w czasie formowania liuszczyń — leaves during the formation of pods

Rys. 6a. Zawartość tokoferoli (średnia  $\pm$  odchylenie standardowe) w anatomicznych częściach rośliny w różnych fazach rozwojowych  
*The content of tocopherols (mean  $\pm$  standard deviation) in the anatomical parts of the plant at different stages of development (Siger 2007)*



A — zawiązki kwiatowe — *flower buds*    B — kwiaty — *flowers*    C — łuszczyzny — *pods*    D — nasiona — *seeds*  
 Rys. 6b. Zawartość tokoferoli (średnia ± odchylenie standardowe) w anatomicznych częściach rośliny w różnych fazach rozwojowych  
*The content of tocopherols (mean ± standard deviation) in the anatomical parts of the plant at different stages of development (Siger 2007)*

W początkowej fazie rozwoju kwiatostanu obserwowano wzrost zawartości tokoferoli. Dominującym homologiem jest  $\alpha$ -T, którego ilość wzrosła w kwiatach z 21,5 do 30,0 mg/100 g s.m. (odmiana Kana) oraz z 15,2 do 22,4 mg/100 g s.m. (odmiana Spencer). W czasie wegetacji rzepaku podczas tworzenia łuszczyń nastąpił spadek zawartości wszystkich homologów tokoferoli. W nasionach zaobserwowano wzrost homologu  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -T. Podobną zależność zauważyła Nogala-Kałużka i inni (2002) w badaniach na rzepaku jarym. Również w łuszczykach obserwowano spadek zawartości tokoferoli, a ich wzrost w nasionach – szczególnie  $\gamma$ -T (do 18,9 mg/100 g s.m.). Według Hofius i Sonnewald (2003) w częściach niefotosyntetyzujących (nasionach) występuje więcej  $\gamma$ -T, który skuteczniej chroni polienowe kwasy tłuszczowe przed utlenianiem. Również Goffman i Bohme (2001) twierdzą, że  $\gamma$ -T lepiej stabilizuje lipidy nasion. Z innych prac dotyczących biosyntezy tokochromanoli w różnych nasionach wynika, że za powstawanie odpowiednich natywnych form tokoferoli jest odpowiedzialna głównie  $\gamma$ -metylotransferaza, przy czym nie wpływa ona na ilościowe tworzenie się tych związków (Shintani i in. 1998). Natomiast warunki klimatyczno-glebowe panujące podczas wegetacji roślin i dojrzewania nasion, np. temperatura i nasłonecznienie, w znaczny sposób mogą wpływać na późniejszą zawartość tych związków w nasionach (Janiszowska 1986). Fakt, że całkowita zawartość poszczególnych homologów i ich wzajemny stosunek różnią się i zmieniają się pod względem ilościowym w różnych częściach rośliny oraz w trakcie rozwoju, wskazuje na to, że ten szlak metaboliczny jest wysoce regulowany, a także wysoce elastyczny i ma znaczenie dla jakościowej i ilościowej zawartości produktów końcowych, w znaczeniu molekularnym i genetycznym (DellaPenna 2005).

Zawartość PC-8 w liściach rzepaku wzrasta również podczas wegetacji rośliny (tab. 1). Odmiana Spencer charakteryzowała się wyższą zawartością PC-8 (3,8 mg/100 g s.m.) w liściach podczas formowania łuszczyń niż odmiana Kana (2,7 mg/100 g s.m.). Wzrost zawartości PC-8 obserwowano także od zawiązków kwiatowych, poprzez kwiaty i łuszczyzny do nasion (tab. 1). W odmianie Kana był to wzrost od 0,1 do 5,4 mg/100 g s.m., a w odmianie Spencer od 0,1 do 6,7 mg/100 g s.m.

Tabela 1

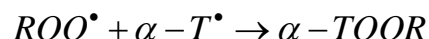
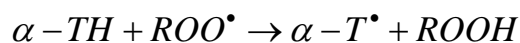
Zawartość sumy tokoferoli oraz PC-8 w anatomicznych częściach rośliny w różnych fazach rozwojowych — *The content of total-T and PC-8 in the anatomical parts of the plant at different stages of development*

Próba Sample	Zawartość — Content [mg/100 g]			
	Suma tokoferoli — Total-T		PC-8	
	odmiana — cultivar			
	Kana	Spencer	Kana	Spencer
Liście w czasie formowania kwiatów <i>Leaves during the formation of flowers</i>	13,76 ± 0,4	9,49 ± 0,4	0,15 ± 0,1	0,20 ± 0,1
Liście w czasie kwitnienia <i>Leaves at flowering</i>	26,81 ± 0,5	13,82 ± 0,1	0,42 ± 0,2	0,65 ± 0,1
Liście w czasie formowania łuszczyń <i>Leaves during the formation of pods</i>	75,82 ± 0,6	96,1 ± 0,6	2,70 ± 0,1	3,80 ± 0,2
Zawiązki kwiatowe <i>Flower buds</i>	22,28 ± 0,2	15,64 ± 0,8	0,10 ± 0,1	0,11 ± 0,1
Kwiaty — <i>Flowers</i>	31,25 ± 0,4	23,08 ± 0,2	0,30 ± 0,2	0,50 ± 0,1
Łuszczyzny — <i>Pods</i>	13,29 ± 0,3	19,23 ± 0,7	0,45 ± 0,1	0,68 ± 0,1
Nasiona — <i>Seeds</i>	36,04 ± 0,1	34,37 ± 0,3	5,40 ± 0,3	6,70 ± 0,4

### Właściwości i funkcje tokochromanoli w organizmie człowieka

Związki witaminy E aktywne są zaliczane do najważniejszych naturalnych przeciwutleniaczy, obecnych głównie w surowcach i produktach roślinnych. Właściwości antyoksydacyjne związane są z obecnością grupy hydroksylowej w cząsteczce (pozycja 6 w pierścieniu 6-chromanolu). Na skuteczność ich działania ma wpływ stężenie, rodzaj substratu, obecność innych związków działających prooksydacyjnie i synergistycznie, rozpuszczalniki, światło i temperatura (Kamal-Eldin i Appelqvist 1996, Nogala-Kalucka 2005). Antyoksydacyjna aktywność tokoferoli *in vivo* kształtuje się w następującej kolejności  $\alpha$ -T >  $\beta$ -T >  $\gamma$ -T >  $\delta$ -T, natomiast ich aktywność *in vitro* w odwrotnej  $\delta$ -T >  $\gamma$ -T ~  $\beta$ -T >  $\alpha$ -T (Eitenmiller i Lee 2004, Munteanu i in. 2004). Działanie homologów  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -T w organizmie człowieka jest ograniczone, ponieważ w wątrobie są one natychmiast metaboli-

zowane i wydalane z żółcią lub moczem (Eggermont 2006). Stwierdzono, że  $\alpha$ -T3 charakteryzuje się znacznie większą aktywnością przeciwutleniającą niż  $\alpha$ -T (Packer i in. 2001). Natomiast PC-8 posiada aktywność około 1,5 razy większą od  $\alpha$ -T (Olejnik i in. 1997). Zasadniczą rolą tokoferoli i tokotrienoli jako przeciwutleniaczy jest neutralizowanie lipidowych rodników nadtlenkowych powstających w czasie utleniania polienowych kwasów tłuszczowych (PUFA) (Nogala-Kałucka i in. 2007). Wygaszają one rodniki nadtlenkowe poprzez oddanie atomu wodoru, który przyłącza się do rodnika lipidowego. Same przekształcają się w rodniki tokoferoksyłowe, które również mogą wejść w reakcję z kolejnym rodnikiem (Yanishlieva i Marinova 2001, Munne-Bosch 2005, Nogala-Kałucka i Siger 2011).



Jako antyoksydant  $\alpha$ -T dzięki obecności reaktywnej grupy  $-OH$  w pierścieniu jest także efektywnym wygaszaczem tlenu singletowego ( $^1O_2$ ). Może również doprowadzić do usunięcia  $^1O_2$  na drodze reakcji chemicznej, w wyniku czego powstaje epoksyd tokoferolochinonu oraz  $\alpha$ -tokoferylochinon (Kamal-Eldin i Appelqvist 1996, Munne-Bosch i Algre 2002, Nogala-Kałucka i Siger 2011). Chinon  $\alpha$ -tokoferolu w postaci zredukowanej także posiada właściwości antyoksydacyjne (Kruk i Strzałka 1995). Zasadniczą rolą  $\alpha$ -T jako przeciwutleniacza jest wygaszanie lipidowych rodników nadtlenkowych w reakcji utleniania tłuszczów (Wang i Quinn 1999). Posiada zdolność reagowania zarówno z rodnikami nadtlenkowymi, jak i z rodnikami alkoksyłowymi, a stała szybkości reakcji wynosi  $2 \times 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Denisov i Afanas'ev 2005). Według Wijtmansa i in. (2003)  $\alpha$ -T jest najaktywniejszym znanym przeciwutleniaczem rozpuszczalnym w tłuszczach. Jak podaje Ross i in. (2003), spośród homologicznych tokoferoli forma  $\alpha$ -T najszybciej oddaje atom wodoru wolnym rodnikom. W reakcji przeciwutleniającej  $\alpha$ -T przekształca się w dość stabilny rodnik (Schneider 2005). W momencie ataku  $\alpha$ -T przez rodniki nadtlenkowe kwasów tłuszczowych następuje jego przejście w rodnik  $\alpha$ -tokoferoksyłowy (Azzi i in. 2001). Każda cząsteczka  $\alpha$ -T dezaktywuje dwa rodniki, kończąc równocześnie dwie reakcje utleniania, ponieważ oprócz tokoferolu w reakcjach inaktywacji rodników nadtlenkowych udział biorą rodniki tokoferoksyłowe (Burton 1994, Suchocka 2003, Sroka i in. 2005). Rodniki tokoferoksyłowe redukują rodniki nadtlenkowe do wodoronadtlenków, a same utleniają się do  $\alpha$ -tokoferylochinonu ( $\alpha$ -T=O). W membranach jedna cząsteczka  $\alpha$ -T przypada na około 2000 cząsteczek fosfolipidów. Fakt ten tłumaczy szybkość reakcji rodnika nadtlenkowego z  $\alpha$ -T, która jest 10 000 razy większa niż reakcja rodnika z kwasem tłuszczowym (Bramley i in. 2000).

W żywych komórkach efekt przeciwutleniający jest wypadkową działania poszczególnych przeciwutleniaczy. Wykazano synergizm w wygaszaniu tlenu

singletowego pomiędzy  $\alpha$ -T a  $\beta$ -karotenem w błonach lipidowych.  $\beta$ -karoten wykazuje właściwości antyoksydacyjne przy niskim ciśnieniu tlenu, podczas gdy wysokie ciśnienie tlenu znosi jego działanie.  $\alpha$ -T może zastępować  $\beta$ -karoten w ochronie błon lipidowych przed oksydacją. Łańcuch fitylowy zakotwicza cząsteczkę w błonie i nie ma większego wpływu na aktywność antyoksydacyjną tokoferoli (Szymańska i Kruk 2007). Selen i witamina E wykazując działanie synergistyczne zapobiegają stłuszczeniu wątroby i wpływają ochronnie na mięśnie, w tym mięsień sercowy oraz zapobiegają ich dystrofii (Gogolewski i in. 1999, Bielak i Pasterniak 2001). Kwas askorbinowy będący donorem wodoru może regenerować  $\alpha$ -T ze stanu rodnikowego do formy podstawowej (Azzi i Stocker 2000, Munne-Bosch i Algre 2002). Związki witamino-E aktywne (głównie homolog  $\alpha$ -T) mają szczególne znaczenie dla tkanek o wysokiej zawartości PUFA, jak mózg i centralny układ nerwowy, w którym stanowią pierwszą linię obrony przed peroksydacją (Azzi i Stocker 2000). Niezależnie od swoich właściwości przeciwutleniających  $\alpha$ -T moduluje wiele funkcji komórkowych mających związek z procesem miażdżycowym. Hamuje proliferację mięśni gładkich naczyń, zmniejszając grubość ściany naczynia, wpływa także na funkcje płytek krwi zapobiegając ich adhezji i agregacji. W komórkach śródbłonna  $\alpha$ -T wzmacnia syntezę prostacyklin, czynnika rozszerzającego naczynia i hamującego agregację płytek krwi (Nogala-Kalucka 2003). Wykazano również, że  $\alpha$ -T pełni funkcję ochronną w niektórych typach nowotworów, poprzez indukcję apoptozy w komórkach rakowych (Borek 2004, Tamimi i in. 2005). Ostatnie doniesienia sugerują wpływ  $\alpha$ -T na zmniejszanie częstości ataków epileptycznych indukowanych penicyliną. Związane jest to z wygaszaniem reaktywnych form tlenu w mózgu, których zawartość wzrasta podczas napadów epileptycznych (Ayyildiz i in. 2006). Udowodniono, że  $\alpha$ -T bierze udział w regulacji aktywności niektórych enzymów, np. wykazuje działanie hamujące w stosunku do kinazy białkowej C (PKC) i procesów zależnych od PKC (Schneider 2005). Osłabienie aktywności kinazy białkowej C działa hamująco na takie procesy jak: agregacja płytek krwi, produkcja reaktywnych form tlenoazotowych (NO) przez komórki śródbłonna, produkcja nadtlenu przez neutrofile i makrofagi, a także powoduje osłabienie proliferacji komórek mięśni gładkich (Azzi 2004).  $\alpha$ -T zapobiega także tworzeniu potencjalnie rakotwórczych niesymetrycznych produktów rozpadu  $\beta$ -karotenu, tzw.  $\beta$ -apo-karotenoidów (Russell 2002).

Tokoferole znalazły zastosowanie w profilaktyce i leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego poprzez zapobieganie tworzenia się nadtlenu azotu, który sprzyja dysfunkcji śródbłonna. Do inaktywacji nadtlenu azotu jest zdolny zarówno  $\alpha$ - jak i  $\gamma$ -T (Bloodsworth i in. 2000). Powstający aktywny ditlenek azotu nitruje białka powodując stres nitrozacyjny, nie mniej szkodliwy niż oksydacyjny. Jedynie  $\gamma$ -T, występujący naturalnie w żywności, wiąże nieodwracalnie powstający w tej reakcji aktywny ditlenek azotu. Produktem tej reakcji jest 5-NO<sub>2</sub>- $\gamma$ -tokoferol lub

*o*-chinon (czerwień tokoferolowa) (Christen i in. 1997). Gamma-T zapobiega tym samym nitrowaniu zasad w DNA oraz tyrozyny wolnej i związanej z białkami. Właśnie ten homolog witaminy E spowalnia rozwój miażdżycy. Gamma-T nie jest tak aktywny biologicznie jak  $\alpha$ -T, jednak brak podstawnika przy C-5 w pierścieniu aromatycznym czyni go doskonałym wygaszaczem reaktywnych form tlenoazotowych (ditlenek azotu, nadtlenoazotyn). Rola  $\gamma$ -T jako czynnika antykancerogenego opiera się na regulacji poziomu cyklin D1 i E, których podwyższony poziom sprzyja wzmożonym podziałom komórki i nowotworzeniu. Powoduje także zmniejszenie mutagennych utleniaczy peroksyazotynów poprzez tworzenie stabilnych centrów węglowych, blokowanych przez grupy metylowe (Munne-Bosch i Algre 2002, Schneider 2005).

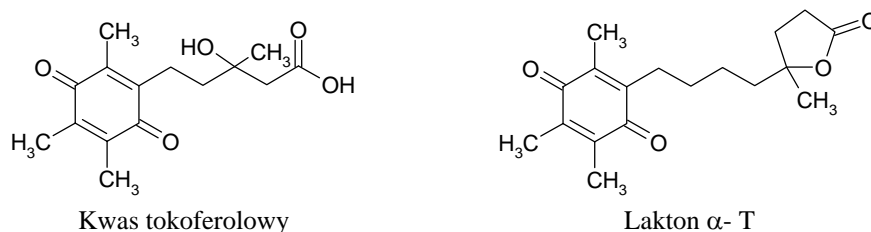
Ostatnie badania zwracają uwagę na tokotrienole, które wykazują wyższą aktywność przeciwutleniającą w układach *in vivo*. Jednakże ich biodostępność po doustnym podaniu jest znacznie ograniczona, gdyż nie są rozpoznawane przez białko transportujące  $\alpha$ -TTP specyficzne tylko do  $\alpha$ -T i w związku z tym ich czas życia jest krótki. Przenikają szybko w głąb skóry, zwalczając efekty stresu oksydacyjnego indukowanego przez promieniowanie UV i ozon (Packer i in. 2001). Tokotrienole obniżają poziom cholesterolu i lipoprotein w surowicy, co może zapobiegać chorobom układu krążenia i serca. Wykazują działanie przeciwzakrzepowe, przeciwnowotworowe oraz neuroprotektoryjne, mogące zapobiegać neurodegeneracyjnym chorobom, takim jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy Huntingtona (Theriault i in. 1999, Packer i in. 2001). Aktywność biologiczna tokoferoli i tokotrienoli jest całkowicie niezależna od ich właściwości przeciwutleniających. Najnowsze badania ujawniają także rolę tokotrienoli, w tym szczególnie  $\alpha$ -T3, w całkowitej ochronie neuronów poprzez mechanizm wynikający z ich właściwości przeciwutleniających. Suplementacja diety tymi związkami podawana doustnie powoduje przenikanie ich do mózgu i zapewnia ochronę układu odpornościowego (Khanna i in. 2004). Badania epidemiologiczne potwierdzają również rolę  $\gamma$ -T jako związku chemoprewencyjnego, skuteczniejszego niż  $\alpha$ -T (Campbell i in. 2003). Scharakteryzowano także mechanizm działania tokotrienoli w supresji komórek nabłonka gruczołu piersi CL-S1, jako elementu przemawiającego za działaniem zdrowotnym tych związków w stosunku do raka piersi (Shah i Sylvester 2005).

## **Biomarkery tokochromanoli w organizmie człowieka**

---

Biomarkery w organizmach żywych definiowane są jako wskaźniki obrazujące przebieg określonego procesu biologicznego do jego punktu końcowego. Z uwagi na uczestnictwo w wielu reakcjach w naszym organizmie tokoferoli/tokotrienoli, a w szczególności homologu  $\alpha$ -T w badaniach nad jego fizjologicznymi przemia-

nami wykazano powstawanie wielu związków. Pierwszą grupę stanowią substancje o rozerwanej strukturze pierścienia chromanolu (rys. 7), które określane są m.in. jako metabolity Simona (kwas tokoferolowy, lakton tokoferolu), a powstają głównie na drodze reakcji utleniania w naszym organizmie.



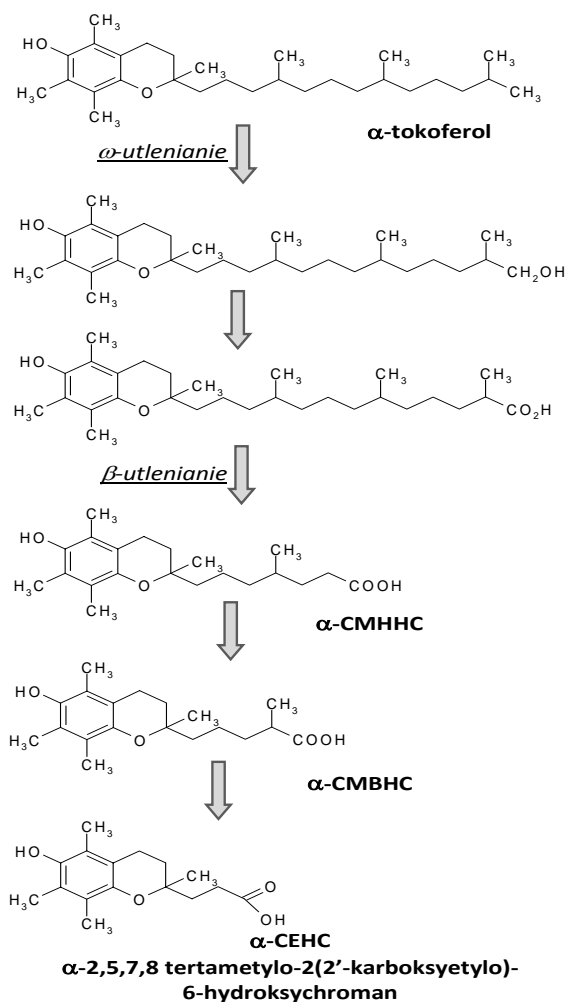
Rys. 7. Wzory strukturalne metabolitów Simona — *The structural formulas Simon metabolites*

W wyniku przemian tworzą się związki chinonowe, np. tokoferylchinon ulega konwersji do tokoferylhydrochinonu, a następnie reaguje z kwasem glukuronowym w wątrobie. Powstający w efekcie końcowej degradacji w nerkach lakton  $\alpha$ -T może być obecny w moczu (Bramley i in. 2000). Metabolity Simona posiadające krótszy łańcuch boczny i otwartą strukturę pierścienia chromanu wskazują na wykorzystanie *in vivo* przeciwutleniających właściwości  $\alpha$ -T. Poziom tych metabolitów znacząco rośnie w moczu zdrowych ochotników przyjmujących dziennie 2–3g *all rac*- $\alpha$ -T.

Druga grupa to związki o skróconym łańcuchu fitynowym i o nienaruszonej strukturze pierścienia chromanolu, np. z  $\alpha$ -T powstaje  $\alpha$ -CEHC ( $\alpha$ -2,5,7,8-tetrametylo-2(2'-karboksyetylo)-6-hydroksychroman) (Galli i in. 2002, 2004) (rys. 8). Nienaruszona struktura pierścienia sugeruje, że  $\alpha$ -CEHC powstaje z  $\alpha$ -T, który nie uczestniczy w reakcjach jako przeciwutleniacz (Schultz i in. 1995, Schuelke i in. 2000).

Szlak degradacji łańcucha bocznego prowadzi przez  $\omega$ -, a następnie  $\beta$ -utlenianie. Pierwszy krok  $\omega$ -hydroksylacji łańcucha bocznego katalizowany jest przez działanie cytochromu P450 (Clifford i in. 2006). Pozostałe homologu tokoferoli tworzą analogiczne związki  $\gamma$ -CEHC i  $\delta$ -CFHC. Metabolitowi  $\gamma$ -CEHC w przeciwieństwie do  $\alpha$ -CEHC przypisuje się właściwości natriuretyczne (regulacja gospodarki wodno-sodowej i utrzymanie homeostazy układu sercowo-naczyniowego) (Zingg i Azzi 2005). Zarówno  $\gamma$ -T jak i  $\gamma$ -CEHC hamują także aktywność cyklooksygenazy-2 (COX-2). Oznaczanie tych związków uznano za wskaźniki wykorzystania tokoferoli w przemianach metabolicznych związanych głównie z wykorzystaniem tokochromanoli jako substancji o właściwościach witaminy E.





Rys. 8. Produkty utleniania i metabolicznego rozpadu  $\alpha$ -T — *The products of oxidation and metabolic degradation of  $\alpha$ -T*

## Literatura

- Abidi S.I., List G.R., Rennick K.A. 1999. Effect of genetic modification on the distribution of minor constituents in canola oil. *JAOCS*, 76: 463-467.
- Ajjawi I., Shintani D. 2004. Engineered plants with elevated vitamin E: a nutraceutical success story. *Trends Biotechnol.*, 22: 104-107.
- Ayyildiz M., Yildirim M., Agar E. 2006. The effects of vitamin E on penicillium-induced epileptiform activity in rats. *Exp Brain Res.*, 174: 109-113.

- Azzi A. 2004. The role of  $\alpha$ -tocopherol in preventing disease. *Eur. J. Nutr.*, 43, 18-25.
- Azzi A., Breyer I., Feher M., Ricciarelli R., Stocker A., Zimmer S., Zingg J. 2001. Nonantioxidant function of alpha-tocopherol in smooth muscle cells. *J. Nutr.*, 131: 378S-81S.
- Azzi A., Stocker A. 2000. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog. Lipid Res.*, 39: 231-255.
- Bartkowiak-Broda I., Muśnicki C., Grzebisz W., Praczyk T. 2005. Rozwój rzepaku. W: *Technologia produkcji rzepaku*. Wieś Jutra, Warszawa, 40-51.
- Bielak E., Pasternak K. 2001. Biologiczna rola witaminy E. *Brom. Chem. Toksykol.*, XXXIV, 1: 29-33.
- Bloodsworth A., O'Donnell V., Freeman B.A. 2000. Nitric oxide regulation of free radical and enzyme mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20, 1707-1715.
- Borek C. 2004. Dietary antioxidant and human cancer. *Integr. Cancer Ther.*, 3: 333-341.
- Bramley P.M., Elmadfa I., Kafatos A., Kelly F.J., Manios Y., Roxborough H.E., Schuch W., Sheehy P.J.A., Wagner K.H. 2000. Vitamin E. *J. Sci. Food Agric.*, 80: 913-938.
- Burton G.W. 1994. Vitamin E: molecular and biological function. *Proc. Nutr. Soc.*, 53: 251-62.
- Campbell S., Stone W., Whaley S., and et al. 2003. Development of gamma-tocopherol as a colorectal cancer chemopreventive agent. *Crit. Rev. Oncology/Hematology*, 47: 249-259.
- Christen S., Woodall A.A., Shigenaga M.K., Southwell-Keely P., Duncan M.W., Ames B.N. 1997.  $\gamma$ -tocopherol traps mutagenic electrophiles such as  $\text{NO}_x$  and complements  $\alpha$ -tocopherol: physiological implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 3217-3222.
- Clifford A.J., Moura F., Ho C.C., Chuang J.C., Follett J., Fadel J.G. Novotny J.A. 2006. A feasibility study quantifying in vivo human  $\alpha$ -tocopherol metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*, 84: 1430-1441.
- DellaPenna D. 2005. A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *J. Plant Physiol.*, 162: 729-737.
- DellaPenna D. 2005a. Progress in the dissection and manipulation of vitamin E synthesis. *Trends Plant Sci.*, 10: 574-579.
- DellaPenna D., Pogson B.J. 2006. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57: 11-38.
- Denisov E.T., Afanas'ev I.B. 2005. *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology*. Boca Raton: Taylor & Francis.
- Dolde D., Vlahakis C., Hazebrock J. 1999. Tocopherols in breeding lines and effects of planting location, fatty acid composition and temperature during development. *JAOCS*, 76: 349-355.
- Dörmann P. 2007. Functional diversity of tocopherols in plants. *Planta*, 225: 269-276.
- Eggermont E. 2006. Recent advances in vitamin E metabolism and deficiency. *Eur. J. Biochem.*, 165: 429-434.
- Eitenmiller R., Lee J. 2004. *Vitamin E – food chemistry, composition and analysis*. Marcel Dekker, New York, USA.
- Galli F., Stabile A.M., Betti M., Conte C., Pistilli A., Rende M., Floridi A., Azzi A. 2004. The effect of alpha- and gamma-tocopherol and their carboxyethyl hydroxychroman metabolites on prostate cancer cell proliferation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 423: 97-102.
- Galli F., Lee R., Dunster C., Kelly F.J. 2002. Gas chromatography mass spectrometry analysis of carboxyethyl-hydroxychroman metabolites of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol in human plasma. *Free Rad. Biol. Med.*, 32, 4: 333-340.
- Goffman F.D., Bohme T. 2001. Relationship between fatty acid profile and vitamin E content in maize hybrids (*Zea mays* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 49: 4990-4994.

- Gogolewski M., Jasińska-Stępnik A., Bartkowiak-Fludra E. 1999. Właściwości przeciwutleniające i rozpad  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokoferoli oraz  $\beta$ -karotenu w zmodyfikowanym teście Bickoffa. *Brom. Chem. Toksyk.*, XXXII: 15-20.
- Herbers K. 2003. Vitamin production in transgenic plants. *J. Plant Physiol.*, 160: 821-829.
- Hofius D., Sonnewald U. 2003. Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology. *Trends Plant Sci.*, 8: 6-8.
- Janiszowska W. 1986. Biosynteza tokoferoli. *Post. Biochem.*, 32: 79-96.
- Kamal-Eldin A., Appelqvist L.A. 1996. The chemistry and antioxidant properties of the tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31: 671-701.
- Khanna S., Roy S., Ryu H., Bahadduri P., Swaan P.W., Ratan R.R., Sen C.K. 2004. Molecular basis of vitamin E action: tocotrienol modulates 12-lipoxygenase, a key mediator of glutamate-induced neurodegradation. *J. Biol. Chem.*, 278: 43508-43515.
- Kruk J., Strzałka K. 1995. Occurrence and function of  $\alpha$ -tocopherol quinone in plants. *J. Plant Physiol.*, 145: 405-409.
- Kumar R., Raclaru M., Schüzeler T., Gruber J., Sadre R., Lühs W., Zarhloul K.M., Friedt W., Enders D., Frentzen M., Weier D. 2005. Characterization of plant tocopherol cyclases and their over-expression in transgenic *Brassica napus* seeds. *FEBS Lett.*, 579: 1357-1364.
- Logde J.K. 2005. Vitamin E bioavailability in humans. *J. Plant Physiol.*, 162: 790-796.
- Munne-Bosch S. 2005. The role of  $\alpha$ -tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol.*, 162: 743-748.
- Munne-Bosch S., Algre L. 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Plant Sci.*, 21/1: 31-57.
- Munne-Bosch S., Falk J. 2004. New insights into the function of tocopherols in plants. *Planta*, 218: 323-326.
- Munteanu A., Zingg J.M., Azzi A. 2004. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E – myth or reality? *J. Cell. Mol. Med.*, 8: 59-76.
- Nogala-Kałucka M. 2003. Fat-soluble vitamins. W: *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*, eds. Z. Sikorski and A. Kołakowska, CRC PRESS, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., pp. 109-132.
- Nogala-Kałucka M., Korczak J., Lampart-Szczapa E., Dratwia M., Siger A., Buchowski M. 2005. Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherol in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. *Food Chem.*, 93: 227-235.
- Nogala-Kałucka M., Kupczyk B., Polewski K., Siger A., Dwiecki K. 2007. Influence of native antioxidants on the formation of fatty acid hydroperoxides in model systems. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 109, 10: 1028-1037.
- Nogala-Kałucka M. 2007. Tokochromanole – biosynteza, struktura i właściwości fizykochemiczne. W: *Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne*. Grajek W. (red.). WNT, Warszawa, 177-184.
- Nogala-Kałucka M., Gogolewski M., Muśnicki C. 2002. Changes of tocopherol and plastochromanol-8 contents during growth of the spring oilseed rape plant (*Brassica napus* L.). *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXIII: 157-164.
- Nogala-Kałucka M., Siger A. 2011. Free radicals in biological and food systems. In: *Frying of food. Oxidation, nutrient and non-nutrient antioxidants, biologically active compounds and high temperatures*, eds. D. Boskou, I. Elmalfa. Taylor & Francis, Boca Raton, pp. 49-69.
- Olejnik D., Gogolewski M., Nogala-Kałucka M. 1997. Isolation and some properties of plastochromanol-8. *Nahrung*, 41: 101-104.

- Packer L., Weber S.U., Rimbach G. 2001. Molecular aspects of  $\alpha$ -tocotrienol antioxidant action and cell signaling. *J. Nutr.*, 131: 369-373.
- Quershi A.A., Mo H., Packer L., Peterson D.M. 2000. Isolation and identification of Novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant and antitumor properties. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3130-3140.
- Rolland N., Ferro M., Seigneurin-Berry D., Garin J., Block M., Joyard J. 2009. The chloroplast envelope proteome and lipidome. In: *The chloroplast: interactions with the environment*, eds. A.S. Sandelius, H. Aronsson. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 41-88.
- Ross L., Barclay C., Vinqvist M.R. 2003. Phenols as antioxidants. In: *The chemistry of phenols*, ed. Z. Rappoport, Chichester: John Wiley & Sons. 839-908.
- Russell R.M. 2002. Beta-carotene and lung cancer. *Pure Appl. Chem.*, 74: 1461-1467.
- Schneider C. 2005. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49: 7-30.
- Schultz M., Leist M., Petzika M., Gassmann B., Brigelius-Flohe R. 1995. Novel urinary metabolite of alpha-tocopherol, 2,5,7,8-tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman, as an indicator of an adequate vitamin E supply? *Am. J. Clin. Nutr.*, 62: 1527S-1534S.
- Schuelke M., Elsner A., Finckh B., Kohlschütter A., Huber C., Brigelius-Flohé R. 2000. Urinary  $\alpha$ -tocopherol metabolites in  $\alpha$ -tocopherol transfer protein-deficient patients. *J. Lipid Res.*, 41: 1543-1551.
- Setiadi D.H., Chass G.A. 2003. Vitamin E models. Shortend sidechain models of  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  tocopherol and tocotrienol – a density functional study. *J. Mol. Struct.*, 637: 11-26.
- Shah S., Sylvester P.W. 2005. Gamma-tocotrienol inhibits neoplastic mammary epithelial cell proliferation by decreasing Akt and nuclear factor  $\kappa$ B activity. *Exp. Biol. Med.*, 230: 235-41.
- Shintani D., DellaPenna D. 1998. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science*, 282: 2098-2100.
- Siger A. 2007. Natywne przeciwutleniacze rzepaku i ich przemiany w wybranych procesach technologicznych. Rozprawa doktorska, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu.
- Sroka Z., Gamian A., Cisowski W. 2005. Niskocząsteczkowe związki przeciwutleniające pochodzenia naturalnego. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 59: 34-41.
- Suchocka Z. 2003. Antyoksydacyjny paradoks witaminy E. *Czynniki Ryzyka*, 4: 58-66.
- Szymańska R., Kruk J. 2007. Występowanie oraz funkcja tokochromanoli u roślin, zwierząt i u człowieka. *Post. Biochem.*, 53: 174-181.
- Tamimi R.M., Hankinson S.E., Campos H., Spiegelman D., Hang S., Golditz G.A., Willett W.C., Hunter D.J. 2005. Plasma carotenoids, retinol and tocopherols and risk of breast cancer. *Am. J. Epidem.*, 161: 153-160.
- Theriault A., Chao J-T., Wang Q., Gapor A., Adeli K. 1999. Tocotrienols: a review of its therapeutic potential. *Clin. Biochem.*, 32: 309-319.
- Wang X., Quinn P.J. 1999. Vitamin E and its function in membranes. *Prog. Lipid Res.*, 38: 309-336.
- Wijtmans M., Pratt D.A., Valgimigli L., et al. 2003. 6-Amino-3-pyridinols: towards diffusion-controlled chain-breaking antioxidants. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 42: 4370-3.
- Yanishlieva N.V., Marinova E.M. 2001. Stabilization of edible oils with natural antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 103: 752-767.
- Zingg J.M., Azzi A. 2005. Significance of the  $\alpha$ -tocopherol salvage pathway. In: *Free radicals and diseases: gene expression, cellular metabolism and pathophysiology*, ed. T. Grune. IOS Press, Amsterdam, Netherlands, 113-136.