



Biotechnologia w walce z reaktywnymi formami tlenu

Robert Nawrot¹, Anna Goździcka-Józefiak^{1,2}

¹Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

²Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, Poznań

Biotechnology to combat reactive oxygen species

Summary

Increased generation of reactive oxygen species (ROS) lies at the background of many diseases, including cancer. Numerous experimental data show that ROS play direct and indirect role in induction and promotion of cancer. Antioxidants, such as glutathione, bilirubin, urate, carotenoids, ascorbate, tocopherols, retinol, belong to nonenzymatic protective mechanisms against ROS antioxidants. A number of plants are rich source of egzogenic antioxidants. Genetic engineering methods are used to modify food plants in the hope that it will elevate their antioxidant content. The recent successful developments are β -carotene-rich "golden rice" and tomato. Intake of these plants could contribute to health benefits worldwide.

Key words:

biotechnology, reactive oxygen species, ROS, cancer, carcinogenesis, ascorbic acid, tocopherol, carotenoids, retinol, golden rice.

1. Wstęp

W ostatnich latach nastąpił znaczny wzrost zainteresowania badaczy reaktywnymi formami tlenu (RFT) i antyoksydantami chroniącymi organizm żywy przed ich szkodliwym działaniem.

WzmóŜone wytwarzanie RFT związane jest z wieloma chorobami. Wśród nich wymienia się chorobę Parkinsona, astmę, AIDS, zespół Downa, chorobę Alzheimera, miażdżycę, cukrzycę, zaćmę, choroby autoimmunizacyjne – liszaj rumieniowaty, gościec stawowy, obrzmienia, zapalenia, uszkodzenia pourazowe – bądź

Adres do korespondencji

Anna Goździcka-Józefiak,
Zakład Wirusologii
Molekularnej UAM,
ul. Międzychodzka 5,
60-371 Poznań.

biotechnologia

2 (57) 88–101 2002

niedokrwienne, uszkodzenia po reperfuzji oraz nowotwory (1). W organizmie człowieka poziom wolnych rodników jest regulowany przez antyoksydanty endogenne i egzogenne.

Bogatym źródłem antyoksydantów egzogennych są rośliny. Dlatego duże nadzieje wiąże się z modyfikowaniem metodami inżynierii genetycznej warzyw i roślin uprawnych w celu zwiększenia w nich zawartości związków przeciwutleniających. Spożywanie takich roślin z pewnością mogłoby się przyczynić do polepszenia sytuacji zdrowotnej w wielu rejonach świata.

2. Reaktywne formy tlenu (RFT)

Do reaktywnych form tlenu zaliczamy zarówno wolne rodniki tlenowe, jak i pochodne nie będące rodnikami. Wolnym rodnikiem nazywamy atom (lub cząsteczkę) zdolny do samodzielnego istnienia i mający jeden lub więcej niesparowanych elektronów na orbicie walencyjnej, charakteryzujący się na ogół wysoką reaktywnością. Rodnikami tlenowymi są: anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$, rodnik wodorotlenowy $\bullet OH$, a także tlenek azotu NO^{\bullet} , który obecnie częściej uznawany jest jednak za reaktywną formę azotu. Do RFT należą również nie będące rodnikami pochodne tlenu, takie jak: H_2O_2 , tlen singletowy 1O_2 , kwas podchloryny $HOCl$, nadtlenoazotyn $ONOO^-$, rodnik nadtlenkowy ROO^{\bullet} czy ozon O_3 . Reakcje RFT z cząsteczkami organicznymi prowadzą do powstawania wolnych rodników substancji organicznych.

W organizmie stale zachodzą reakcje wytwarzające pewne ilości reaktywnych form tlenu. Głównym źródłem ich produkcji w komórce zwierzęcej są mitochondria, peroksisomy, enzymy związane z cytochromem P-450 (2). Dużo RFT wytwarzają fagocyty. Poznano także wiele czynników egzogennych sprzyjających ich powstawaniu (np. promieniowanie jonizujące, nadfioletowe, metale ciężkie, np. chrom, nikiel) lub nawet wprowadzających je do organizmu, np. substancje smoliste będące wynikiem spalania paliw stałych, gazy wydechowe silników spalinowych oraz dym powstający podczas palenia tytoniu. Substancje smoliste znajdujące się w jednym „wdechu” dymu tytoniowego zawierają aż 10^{14} rodników, z których większość jest bardzo stabilna (1). Okazuje się również, że źródłem RFT może być niewłaściwa dieta. Na przykład przygotowanie potraw w obecności olei związane jest z wytwarzaniem nadtlenków lipidowych (3).

Zaburzenie fizjologicznej równowagi pomiędzy wytwarzaniem RFT i działaniem systemów antyoksydacyjnych, w tym mechanizmów naprawczych, prowadzi do stresu oksydacyjnego. RFT działając na DNA wywołują zaburzenia w strukturze i funkcjonowaniu tej cząsteczki, odpowiedzialne za mutacje w genach. Kumulacja mutacji w genomie pojedynczej komórki często prowadzi do jej transformacji i rozwoju nowotworu (4).

W licznych danych doświadczalnych wskazuje się na pośredni lub bezpośredni udział RFT w indukcji i promocji nowotworów. Powstawanie nowotworów jest pro-

cesem wieloetapowym, kontrolowanym przez liczne geny. Główną rolę w tym procesie odgrywają jednak mutacje w protoonkogenach i genach supresorowych, których produktami są białka biorące udział w regulacji różnicowania i wzrostu komórek. Stąd ich nieprawidłowe funkcjonowanie odpowiada za zaburzenia w regulacji cyklu komórkowego i niekontrolowaną proliferację komórki. Powstające uszkodzenia w obu typach genów prowadzą często do aktywacji protoonkogeny i inaktywacji genu supresorowego (5).

Wiele znanych kancerogenów i promotorów nowotworów stanowi bądź to bezpośrednie źródło RFT, bądź też przyczynia się pośrednio do ich wytwarzania poprzez aktywację endogennych układów enzymatycznych. Na przykład benzopiren ulega w organizmie żywym wielu przemianom, podczas których między innymi wytwarzane są $O_2^{\bullet-}$ oraz H_2O_2 i $\bullet OH$. Reakcji takiej *in vivo* towarzyszy stan zapalny skóry, czyli obecność dużej ilości stymulowanych leukocytów. Prawdopodobnie wolne rodniki tlenowe uwalniane przez stymulowane fagocyty mogą mieć również udział w procesie powstawania nowotworu (6).

Wiadomo obecnie, że 90% przypadków raka płuc, jednej z najczęściej występujących form nowotworu, zarówno u kobiet, jak i mężczyzn, powiązanych jest z paleniem tytoniu. Człowiek palący papierosy, jak już wspomniano, wdycha ogromne ilości wolnych rodników. Przez okres około 30 lat trwa progresja zmian komórkowych, prowadzących do akumulacji wielorakich mutacji i w konsekwencji transformacji nowotworowej komórki. Niezbędna jest też stała ekspozycja na czynniki kancerogenne, ponieważ, jak wykazano, rezygnacja z nałogu palenia tytoniu znacznie zmniejsza ryzyko wystąpienia choroby (3).

Innym rodzajem nowotworu, w którym najbardziej prawdopodobnymi czynnikami odpowiedzialnymi za kancerogenezę są RFT, jest rak prostaty. Jest to choroba występująca najczęściej u mężczyzn w wieku 70-80 lat, można zatem wnioskować, że zmiany prowadzące do rozwoju tej jednostki chorobowej akumulują się w przebiegu 30-40 lat (3).

3. Mechanizmy obronne organizmu przed RFT

W toku ewolucji organizmy żywe wykształciły szereg mechanizmów, zarówno enzymatycznych, jak i nieenzymatycznych, chroniących je przed szkodliwym działaniem RFT. Proces ten rozpoczął się prawdopodobnie przed 2,5 miliardami lat, kiedy zawartość tlenu w atmosferze Ziemi uległa znacznemu podwyższeniu.

Do enzymów chroniących komórki przed RFT należą dysmutaza ponadtlenkowa (oksydoreduktaza ponadtlenkowa SOD, E.C. 1.15.1.1), która katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego, katalaza (oksydoreduktaza nadtlenu wodoru, E.C. 1.11.1.6), katalizująca reakcję dysproporcjonacji nadtlenu wodoru, peroksydaza glutationowa (oksydoreduktaza glutation: nadtlenek wodoru, E.C. 1.11.1.9), która katalizuje reakcję pomiędzy glutationem (GSH) a nadtlenkiem wodoru, w wy-

niku której powstaje disulfid glutationu (GSSG) oraz współdziałająca z nią reduktaza glutationowa (E.C. 1.6.4.2), enzym, który odtwarza zredukowaną formę glutationu utleniając NADPH.

Poza tym istnieją cząsteczki nieenzymatyczne, wśród których wyróżnić można kompleksy jonów metali grup przejściowych i wolne jony, biorące udział w reakcjach dysmutacji rodników, oraz antyoksydanty (antyutleniacze, przeciwutleniacze), nazywane także „zmiataczami” wolnych rodników. Do endogennych antyutleniaczy należą m.in. glutation, kwas moczowy i bilirubina (tab. 1).

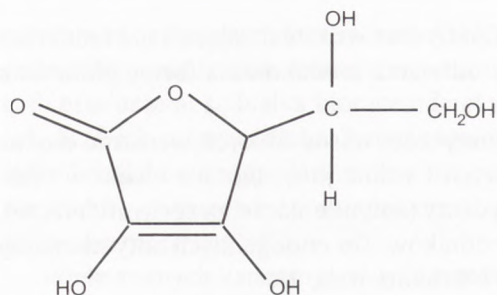
Tabela 1

Antyoksydanty nieenzymatyczne obecne w surowicy ludzkiej (wg 8)

Antyoksydant	Stężenie w surowicy krwi μmol/L
Rozpuszczalne w wodzie	
kwas askorbinowy	30-150
glutation	1-2
mocznik	160-450
bilirubina	5-20
Rozpuszczalne w lipidach	
α-tokoferol	15-40
δ-tokoferol	3-5
α-karoten	0,05-0,1
β-karoten	0,3-0,6
likopen	0,5-1,0
luteina	0,1-0,3
zeaksantyna	0,1-0,2
ubichinol-10	0,4-1,0

Glutation jest tripeptydem zbudowanym w swej podstawowej formie z glutamianu, cysteiny i glicyny. Związek ten występuje powszechnie w komórkach organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Jego funkcją jest utrzymywanie grup tiolowych białek w formie zredukowanej. Bierze on również udział w reakcjach z nadtlenkami organicznymi, z nadtlenkiem wodoru, wolnymi rodnikami, ksenobiotykami i disulfidami białek.

Kwas moczowy występuje w fizjologicznym zakresie pH głównie w formie zdysoncjowanej jako anion moczanowy. Reaguje on z oksydantami, a poza tym wiąże jony żelaza. W wysokich stężeniach jest obecny w tkankach i komórkach organizmu, które są narażone na intensywne działanie oksydantów, jak np. w śluzówce jelita, w śródbłonku, w hepatocytach (7).



Rys. 1. Kwas askorbinowy (witamina C).

Bilirubina, czyli pochodna hemu, i produkt jej utlenienia – biliwerdyna chronią błony komórkowe przed peroksydacją lipidów.

Właściwości antyoksydacyjne wykazują także cysteina, kreatynina, pterydyny (zwłaszcza neopteryna – zwiększone jej wytwarzanie występuje podczas infekcji wirusowej, chorób nowotworowych, samouodpornieniowych i odrzucania przeszczepów), melaniny, żeńskie hormony płciowe – pochodne estronu i estradiolu (oraz produkty ich metabolizmu).

Właściwości antyoksydacyjne ma również szereg substancji egzogennych. Egzogenne „zmiatacze” RFT to m.in. kwas askorbinowy (witamina C), tokoferol (witamina E), karoteny i ich pochodne, np. α -karoten, β -karoten, likopen i ksantofile, np. luteina, zeaksantyna, β -kryptoksantyna. Najlepiej poznane są właściwości witaminy C, E oraz β -karotenu.

Askorbinian, czyli witamina C (rys. 1), jest związkiem egzogennym dla ssaków naczelnych i świniki morskiej, znanym od dawna jako czynnik zapobiegający skorbutowi oraz niezbędny kofaktor w reakcjach hydroksylacji aminokwasów zachodzących podczas biosyntezy kolagenu. Jest on uważany za najistotniejszy antyoksydant hydrofilowy płynów wewnątrz- i pozakomórkowych w organizmie. Dzięki swoim właściwościom redukującym askorbinian stymuluje różnorodne procesy biochemiczne (np. powstawanie kolagenu) przenosząc elektrony. W reakcjach z oksydantami askorbinian w wyniku redukcji dwuelektronowej tworzy dehydroaskorbinian, który może być z powrotem zredukowany do askorbinianu przez enzymy utleniające NADPH, a w niektórych tkankach także glutation (7). Silne zdolności redukujące askorbinianu decydują o jego właściwościach antyoksydacyjnych, wyrażających się w reaktywności wobec $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, $HOCl$, rodników nadtlenkowych i tlenu singletowego. Związek ten jest bardziej efektywny w hamowaniu peroksydacji lipidów niż mocznik, bilirubina i α -tokoferol. Stwierdzono, że jeżeli wolne rodniki powstające w błonach komórkowych są wychwytywane przez tokoferol, mogą być następnie od niego pobierane przez kwas askorbinowy. Stąd witamina C ma również swój udział w odbudowie aktywności witaminy E. Askorbinian jest gromadzony przez większość gatunków ssaków w płynie wodnistym oka, gdzie najprawdopodobniej chroni ten narząd przed szkodliwymi skutkami wzmożonej produkcji

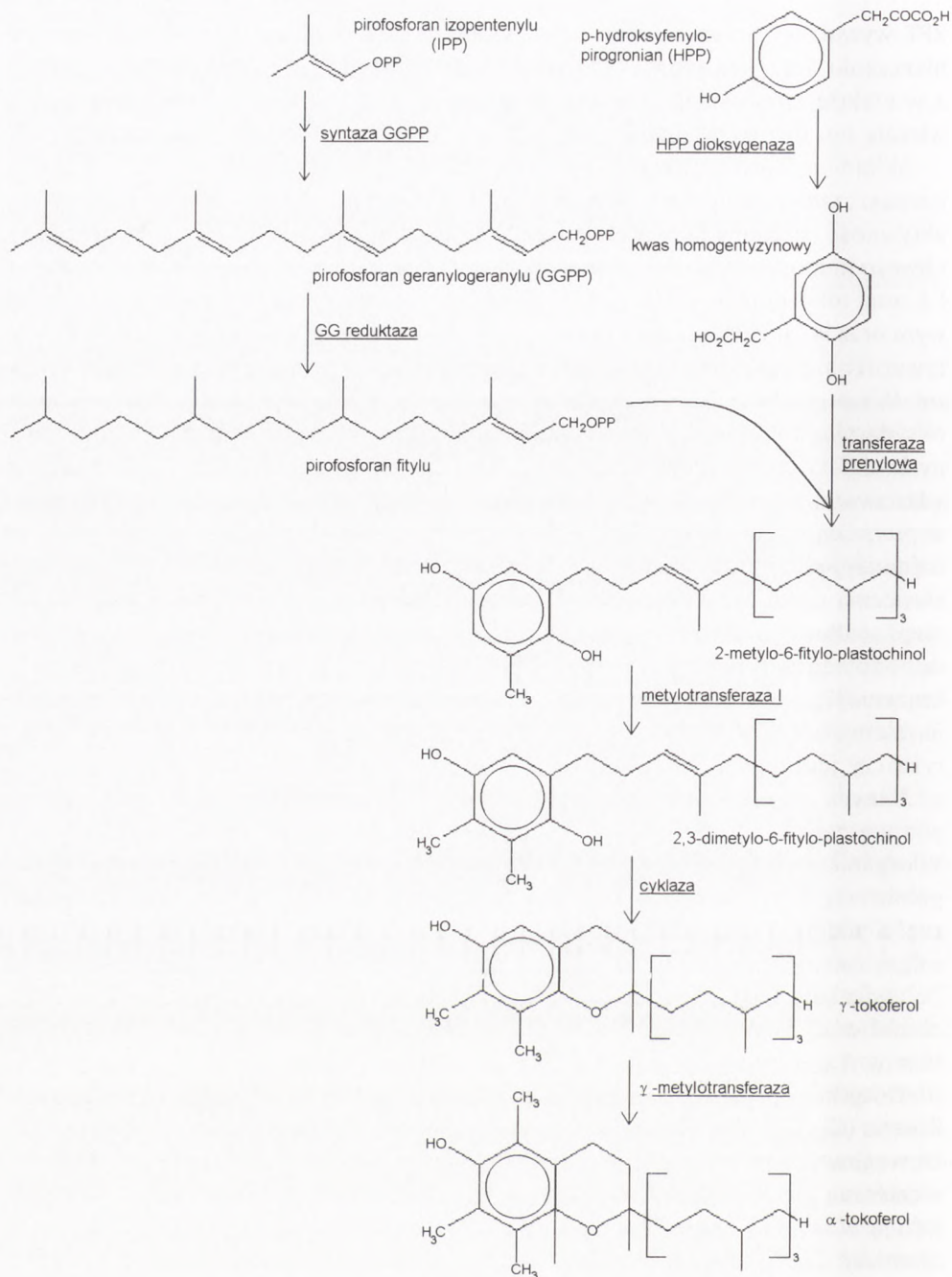
RFT wywołanej przez światło (7,8). Witamina C zapobiega także oksydacyjnemu niszczeniu LDL (*low-density lipoprotein* – lipoproteiny o małej gęstości) i DNA, a w efekcie arteriosklerozie i kancerogenezie (9). Dużo kwasu askorbinowego zawierają np. owoce cytrusowe, kapusta, a z produktów zwierzęcych wątroba (10).

Witamina E jest najważniejszym fizjologicznym antyoksydantem hydrofobowym, rozpuszczalnym w lipidach. Wyróżnić można co najmniej 8 związków wykazujących aktywność witaminy E. Syntetyzowane są one przez rośliny i sinice z terpenoidów i kwasu homogentyzynowego (rys. 2). Do grupy witamin E należą tokoferole: α , β , γ i δ oraz tokotrienole: α , β , γ i δ , różniące się podstawnikami w pierścieniu fenolowym oraz w łańcuchu terpenowym (rys. 3). Różnice te decydują o ich odmiennej aktywności biologicznej (11). Z grupy witamin E najczęściej spotykany jest α -tokoferol. W osoczu krwi człowieka stanowi on 88% całej puli witaminy E. Działanie antyoksydacyjne tokoferoli polega na zmiataniu wtórnych wolnych rodników organicznych, dzięki czemu ulega przerwaniu łańcuch reakcji peroksydacji lipidów. Za ich właściwości antyoksydacyjne odpowiedzialna jest głównie grupa hydroksylowa w pierścieniu fenolowym. Ważne znaczenie ma również obecność w cząsteczce co najmniej jednej grupy metylowej. U człowieka niedobór witaminy E jest przyczyną skrócenia czasu życia erytrocytów, zaburzeń neurologicznych, chorób mięśni oraz nieprawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego. Zwiększa się także prawdopodobieństwo występowania niektórych typów nowotworów i schorzeń układu krążenia (7). Dużo witaminy E z grupy tokoferoli zawierają rośliny oleiste, np. nasiona słonecznika, wiesiołka, zarodki pszenicy, natomiast tokotrienole są w owsie, ryżu czy jęczmieniu.

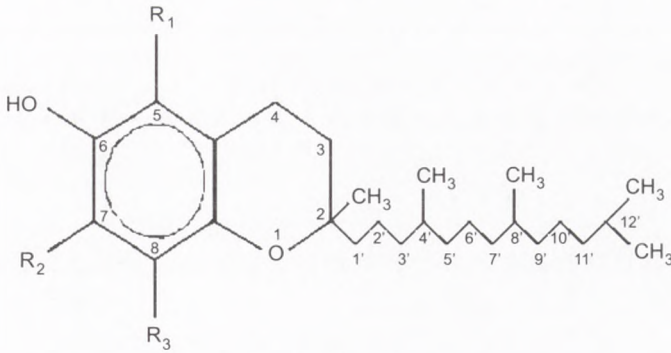
Silnymi antyoksydantami są karotenoidy. Jest to zróżnicowana grupa związków pigmentowych ważnych dla życia szeregu mikroorganizmów, roślin i zwierząt. W organizmach fotosyntetyzujących chronią one chlorofil przed fotooksydacją oraz pełnią rolę w przekazywaniu energii na chlorofil, absorbując światło w niebieskiej części widma. Karotenoidy odpowiedzialne są za różnorodne (od żółtego do różowego) zabarwienia roślin, co ma znaczenie dla ich zapylania i rozsiewania nasion. Ze związków tych powstaje także hormon roślinny – kwas abscysynowy (ABA – *abscisic acid*). W organizmach człowieka i zwierząt karotenoidy są prekursorami witaminy A (retinol) (rys. 5) i innych retinoidów.

Dotychczas zidentyfikowano przeszło 600 różnych karotenoidów, pochodnych fitoenu ($C_{40}H_{56}$). Ten 40-węglowy związek powstaje przez złożenie dwóch dwudziestowęglowych pirofosforanów geranylogeranylu (GGPP). GGPP jest syntetyzowany z czterech pięciowęglowych jednostek izoprenylowych. Wszystkie karotenoidy powstają w wyniku odpowiedniego uwodorowania, odwodorowania, cyklizacji i/lub oksydacji $C_{40}H_{56}$ (rys. 4). W zależności od źródła pochodzenia desaturazy, do fitoenu wprowadzane jest dodatkowo od 1 do 6 wiązań podwójnych. Obecność tych wiązań decyduje o właściwościach antyoksydacyjnych karotenoidów.

Karotenoidy możemy podzielić na dwie grupy: I – do której zaliczamy β -karoten, i II – α -karoten i likopen oraz karotenoidy zawierające tlen (ksantofile, typu



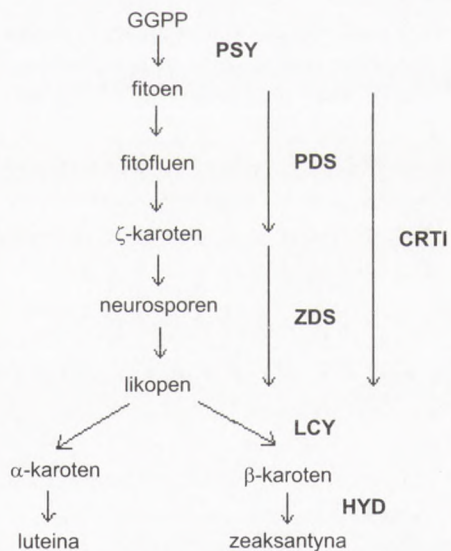
Rys. 2. Szlak biosyntezy tokoferolu. Syntaza GGPP: syntaza pirofosforanu geranylogeranyli; HPP dioksygenaza: dioksygenaza p-hydroksyfenylopirogonianu; GG reduktaza: reduktaza geranylogeranyli (wg 11).



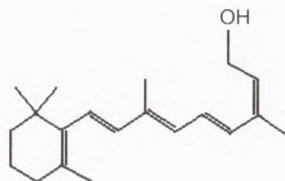
Związek	R ₁	R ₂	R ₃
α-tokoferol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β-tokoferol	CH ₃	H	CH ₃
γ-tokoferol	H	CH ₃	CH ₃
δ-tokoferol	H	H	CH ₃

Rys. 3. Struktura tokoferoli. α-, β-, γ- i δ-tokoferol różnią się liczbą i pozycją grup metylowych w pierścieniu chromanolowym. W α-tokoferolu pierścień chromanolowy jest całkowicie zmetylowany. W β- i γ-tokoferolu pierścień zawiera dwie grupy metylowe, natomiast δ-tokoferol posiada jedną. Tokotrienole mają tę samą podstawową strukturę, ale zawierają dodatkowe wiązania podwójne w terpenoidowym łańcuchu bocznym w pozycjach C-3', C-7' i C-11' (wg 11).

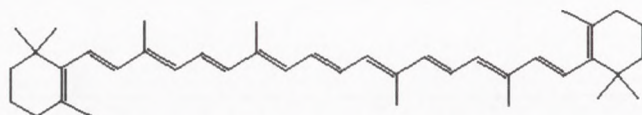
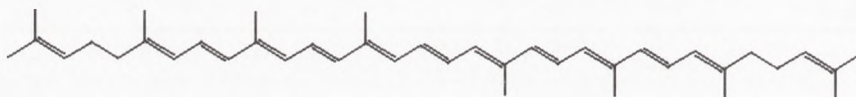
lutein, zeaksantyn i β-kryptoksantyn). Niektóre z nich, tj. β-karoten, α-karoten i β-kryptoksantyna są prekursorami witaminy A, która w ustroju człowieka ulega przekształceniu do retinolu (12).



Rys. 4. Szlak biosyntezy karotenoidów u roślin wyższych i bakterii. Enzymy są wskazane po prawej ze strzałkami ukazującymi odpowiednie kroki katalityczne: PSY, syntaza fitoenu; PDS, desaturaza fitoenu; ZDS, desaturaza ζ-karotenu; LCY, cykazy α- i β-likopenu; HYD, β- i ε-hydroksylazy; CRTI, desaturaza fitoenu z *Erwinia uredovora*; GGPP – pirofosforan geranylogeranylu (wg 26 i 30).



Rys. 5. Retinol.

Rys. 6. β -karoten.

Rys. 7. Likopen.

Karotenoidy o aktywności biologicznej podobnej do witaminy A nazywamy pro-witaminami A, wśród nich najważniejszym jest β -karoten (rys. 6). Z pożywieniem człowiekowi dostarczane są głównie β -karoten oraz witamina A, przede wszystkim w formie estrów retinolu, natomiast w osoczu krwi jest ona obecna głównie w formie *trans*-retinolu. Jej najważniejsze funkcje to podtrzymywanie wzrostu, reprodukcji, procesu widzenia, różnicowania nabłonka, procesów mielinizacji i procesów odpornościowych. Karotenoidy mają też właściwości przeciwnowotworowe (7). Zawarte są one w dużych ilościach, np. w pomidorach, marchwi, szpinaku i brokułach.

Antyoksydanty przyjmowane egzogennie z pożywieniem odgrywają istotną rolę w hamowaniu fazy inicjacji i promocji nowotworów. W odróżnieniu od inicjacji faza promocji nowotworu może być cofnięta lub opóźniona. Wymaga to zwykle stosowania związków antypromocyjnych, a w przypadku naturalnych składników pożywienia ich ciągłego dostarczania w diecie. Aktywność taką ma wiele przeciwutlenia-czy egzogennych, jak np. witamina A i inne retinoidy, tokoferole, sole selenu. Wyka-zano, że witamina E podawana wraz z kwasem askorbinowym hamuje fazę promo-cyjną nowotworów indukowanych u zwierząt laboratoryjnych przez związki N-nitro-zowe i aromatyczne węglowodory policykliczne (13).

Stwierdzono także częstsze występowanie stanów przedrakowych szyjki macicy u kobiet spożywających pokarmy ubogie w witaminę A lub β -karoten w porównaniu z kobietami, które miały dietę prawidłowo zbilansowaną (14). Niedobór witaminy

A można także traktować jako istotny czynnik ryzyka raka płuc i żołądka. Z kolei w innych badaniach zauważono, że regularne podawanie witaminy A i E zmniejsza ryzyko raka prostaty oraz zapadalności na nowotwory okrężnicy. Systematyczne przyjmowanie witaminy E zmniejsza również ryzyko powstawania łagodnych polipów jelita grubego, które często po pewnym czasie przekształcają się w raka okrężnicy (15).

Zaobserwowano także ochronny wpływ pokarmów bogatych w luteinę na powstawanie raka okrężnicy, szczególnie u palaczy (16). Wykazano np., że likopen (rys. 7), karotenoid nadający czerwoną barwę pomidorom, chroni palaczy przed obecnym w dymie tytoniowym rodnikiem NO_2 dwa razy bardziej efektywnie niż β -karoten (17). W przeprowadzonych licznych badaniach wskazuje się również na działanie ochronne likopeny zapobiegające rozwojowi raka prostaty (18).

Antyoksydanty nie zawsze jednak działają antykancerogenicznie, np. wykazano, że uzupełnianie diety palaczy o witaminę E, kwas askorbinowy i koenzym Q nie daje oczekiwanych efektów ochronnych przeciw oksydacyjnym uszkodzeniom DNA. Spodziewany niższy poziom ekskrecji 8-oksodG (8-okso-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozyny – produktu naprawy oksydacyjnie uszkodzonego DNA) do moczu osób przyjmujących antyoksydanty nie różnił się w tych badaniach od poziomu u osób przyjmujących placebo (19).

4. Biotechnologiczne polepszanie wartości odżywczej roślin poprzez zwiększanie zawartości antyoksydantów

Wiele ważnych antyoksydantów, takich jak β -karoten, witaminy A, E lub C, jest obecnych w owocach i warzywach. Związki te mogą być dostarczane do organizmu wraz z pożywieniem. W ten sposób pobierane przeciwutleniacze nie powodują efektów ubocznych, które mogą występować gdy wprowadzamy do ustroju człowieka te związki otrzymane syntetycznie (18-20).

Stwierdzono, że silne właściwości antyoksydacyjne mają także pochodne fenolowe szczególnie obecne w oleju z oliwek, tj. butylohydroksytoluen (BHE), butylohydroksyanizol (BHA), kwasy trihydroksybenzoesowe (21) oraz kwas karnozowy, karnozyl i kwas rozmarynowy, izolowane np. z *Salvia officinalis* (22). BHA jest szeroko stosowany jako dodatek konserwujący do żywności ponieważ zapobiega autoutlenianiu nienasyconych kwasów tłuszczowych (23). Ważnymi przeciwutleniaczami są także flawonoidy i ich izomery izoflawonoidy, zaliczane do grupy związków fenolowych. Są one odpowiedzialne m.in. za antyoksydacyjne właściwości ekstraktów z herbaty czy z miłorzęba japońskiego (*Ginkgo biloba*).

Uzupełnianie diety człowieka o dodatkową ilość antyoksydantów jest bardzo ważne, szczególnie dla ludzi w krajach rozwijających się. Okazuje się, że w wyniku spożywania mało zróżnicowanych produktów cierpią oni na wiele poważnych chorób związanych z niedoborem składników odżywczych, w tym witamin. Ocenia się,

że około 800 milionów ludzi ma za mało pożywienia, a u ponad miliarda, szczególnie kobiet i dzieci, obserwowano określone niedobory pokarmowe (24). Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) niedobór witaminy A stwierdzono u około 10 milionów osób na całym świecie (25). UNICEF szacuje, że zwiększone jej spożycie mogłoby zapobiec śmierci około 1-2 milionów dzieci rocznie w wieku 1-4 lat (26). Dlatego za pomocą metod inżynierii genetycznej tworzy się rośliny transgeniczne zawierające zwiększoną ilość danego składnika odżywczego. W aktualnie przeprowadzanych badaniach skupia się przede wszystkim uwagę na modyfikacjach ryżu, pomidorów, fasoli, pszenicy i kukurydzy. Stało się to możliwe poprzez poznanie struktury i funkcji niektórych z genów biorących udział w biosyntezie karotenoidów, np. syntazy fitoenu (*Psy*, *crtB*), desaturazy fitoenu (*crtI*), β -cyklazy likopenu (*Lcy*), oksygenazy (*CrtO*).

Jednym z najnowszych odkryć na tym polu jest stworzenie bogatego w β -karoten, żółtego ryżu, zwanego „złotym”, przez I. Potrykusa, P. Beyera i wsp. (21). Ryż (*Oryza sativa*), stanowi jeden z podstawowych składników pożywienia na świecie. Jest on spożywany codziennie przez 3 miliardy ludzi. Szacuje się, że do 2020 r. dieta więcej niż połowy ludzkości będzie zależna od ryżu (27). Twórcy „złotego ryżu” mieli na uwadze walkę z niedoborami witaminy A, powszechnymi w wielu krajach Afryki, Azji, Ameryki Łacińskiej, szczególnie tych, w których jest on głównym źródłem pożywienia dla ludności (27). Roślina ta mimo swej wartości odżywczej jest jednak ubogim źródłem wielu podstawowych witamin i minerałów, w tym β -karotenu (prowitaminy A). Bielmo (endosperma) ryżu nie zawiera w ogóle prowitaminy A, lecz jej prekursor, pirofosforan geranylogeranylu. Biosynteza β -karotenu w ryżu stała się możliwa po wprowadzeniu do komórek tej rośliny genu syntazy fitoenu (*Psy*) z żonkila (*Narcissus pseudonarcissus*), genu desaturazy fitoenu (*crtI*) z bakterii *Erwinia uredovora* (należącej do *Enterobacteriaceae*) i genu β -cyklazy likopenu z żonkila (rys. 4). W ten sposób otrzymano kilka stabilnych linii „złotego ryżu” z żółtym bielmem, których komórki wytwarzają wystarczającą ilość β -karotenu, aby pokryć dzienne zapotrzebowanie na ten składnik w typowej diecie azjatyckiej (12,24).

Innym przykładem rośliny wytwarzającej zwiększoną ilość β -karotenu jest transgeniczny pomidor. Owoc pomidora i jego produkty (np. ketchup, soki, zupy i sosy) są głównym źródłem likopenu i β -karotenu. Aby podnieść zawartość karotenoidów w owocu pomidora, do komórek tej rośliny wprowadzono bakteryjny gen (*crtI*), którego produkt białkowy bierze udział w przekształceniu fitoenu do likopenu (rys. 4). Ekspresja tego genu w pomidorach transgenicznych nie zwiększyła wprawdzie całkowitego poziomu karotenoidów, ale zawartość β -karotenu podniosła się trzykrotnie, kosztem likopenu, osiągając poziom około 45% całkowitej puli karotenoidów (26).

Inna modyfikacja genetyczna zmieniająca szlak biosyntezy karotenoidów została przeprowadzona w rzepaku (*Brassica napus*), do którego komórek wprowadzono bakteryjny gen syntazy fitoenu (*crtB*) z *Erwinia uredovora*. Dojrzałe nasiona otrzymanych w ten sposób roślin transgenicznych zawierały około 50 razy więcej karotenoidów, głównie α - i β -karotenu, w porównaniu do roślin nie zmodyfikowanych (12).

W ostatnich latach w przeprowadzonych badaniach zmierza się także do zwiększenia zawartości tokoferoli (witaminy E) w roślinach. Przykładem mogą być modyfikacje prowadzące do nadekspresji metylotransferazy γ -tokoferolu (γ -TMT – ostatniego enzymu syntezy α -tokoferolu) oraz wzrostu aktywności witaminy E w oleju nasienia *Arabidopsis*. Nasiona *Arabidopsis* zawierają dużą ilość γ -tokoferolu, którego aktywność jako witaminy E osiąga tylko 10% tej wykazywanej przez α -tokoferol. Rezultatem ekspresji γ -TMT w nasionach *Arabidopsis* była przemiana dużej puli γ -tokoferolu do α -tokoferolu z odpowiednim 10-krotnym wzrostem aktywności witaminy E (11,29).

W tych udanych próbach zwiększenia zawartości substancji antyoksydacyjnych w roślinach ukazuje się potencjał przyszłych możliwości biotechnologicznych. Aktualnie kontynuowane są badania nad poznaniem mechanizmów odpowiedzialnych za regulację szlaku biosyntezy karotenoidów. Przykładem są prace nad mutacjami blokującymi biosyntezę karotenoidów u ryżu i kukurydzy, dzięki którym możliwe będą dalsze modyfikacje dróg ich biosyntezy (30). Być może w przyszłości uda się polepszyć wartość odżywczą ważnych roślin uprawnych takich jak soja, kukurydza czy rzepak, przez podniesienie w nich poziomu α -tokoferolu kosztem γ -tokoferolu. Spożywanie takich roślin transgenicznych na pewno przyczyniłoby się do polepszenia kondycji zdrowotnej całej populacji ludzkiej (29).

5. Podsumowanie

Z dotychczasowych rozważań wyłania się obraz RFT jako czynników odpowiedzialnych za patogenezę wielu chorób u ludzi, w tym nowotworów. Procesom tym mogą zapobiegać endogenne i egzogenne systemy ochronne.

W przeprowadzanych badaniach nad właściwościami antyoksydacyjnymi różnych leków stosowanych w terapii licznych schorzeń u ludzi wykazano, że niektóre z nich są doskonałymi antyoksydantami. Efekty ich działania mogą zatem, przynajmniej częściowo, zależeć od ich aktywności antyoksydacyjnej, czego nie zawsze byli świadomi badacze wprowadzający je do praktyki lekarskiej. Właściwości takie ma np. kaptopril – lek stosowany w leczeniu nadciśnienia, jak również aspiryna (kwas acetylosalicylowy) (31). Wiele związków stosowanych jako leki wytwarza RFT w wyniku nieenzymatycznej reakcji z tlenem lub cykli oksydacyjno-redukcyjnych zachodzących w komórkach. Na tej zasadzie działają takie leki przeciwnowotworowe jak np. bleomycyna, mitomycyna C czy antracykliny. Wytwarzanie RFT przez niektóre z tych terapeutyków może powodować także komplikacje w leczeniu. Prowadzi się również badania mające na celu rozstrzygnięcie, czy SOD i katalaza mogą łagodzić skutki chorób spowodowanych m.in. zaburzeniami w metabolizmie RFT (7).

Zagrożenie ze strony RFT dla naszych organizmów jest coraz większe w związku z wzrastającym zanieczyszczeniem środowiska. Zmiany w aktywności SOD stwierdzone u ryb i ślimaków w obecności różnych metali i organicznych ksenobiotyków próbuje się również wykorzystać jako bioindykator zanieczyszczeń w morzu (32).

Nasuwa się pytanie – czy należałoby zatem zwiększyć podaż antyoksydantów do organizmu?

Rozwiązaniem może być odpowiednia dieta zapewniająca dostateczne spożycie witamin o właściwościach antyoksydacyjnych, do których niedoboru nie należy dopuszczać. Jednak przesada w przyjmowaniu tych witamin nie jest wskazana. Okazało się, że nie tylko ich brak, ale również nadmiar może mieć właściwości toksyczne, a także kancerogenne. Dotyczy to głównie witaminy A oraz β -karotenu. Zaobserwowano, że pokarmy bogate w retinol zwiększały ryzyko raka przełyku. Szczególnie niebezpieczne okazało się to u palaczy tytoniu i nadużywających alkoholu. Nadmiar witaminy A jest także hepatotoksyczny. Natomiast przyjmowanie większej ilości β -karotenu przez palaczy spowodowało zwiększenie częstości występowania u nich raka płuc (33,34). W przeprowadzonych w ostatnich latach badaniach wskazuje się również na toksyczne działanie BHA. Podawanie BHA w wysokim stężeniu w paszy (1-2% BHA) prowadziło do niekontrolowanej proliferacji komórek nabłonkowych przedłożądka u gryzoni oraz hipertrofii i hiperplazji wątroby (23). Najbezpieczniej jest uzupełnić braki antyoksydantów witaminą C. Spożywanie jej w większych ilościach zaleca się palaczom, a także osobom intensywnie pracującym fizycznie. Nadmiar witaminy E może jednak uszkadzać przeciwbakteryjny mechanizm obronny fagocytów oparty na wytwarzaniu RFT.

Najlepszym sposobem dostarczania do organizmu egzogennych antyoksydantów jest, jak się wydaje, spożywanie odpowiedniej ilości warzyw i owoców, które są naturalnym ich źródłem oraz większości mikroelementów. Ocenia się, że zoptymalizowana dieta mogłaby zmniejszyć zachorowalność na raka o 30-60% (7). Wykazano, że spożywanie brokuł, szpinaku, sałaty, pomidorów, pomarańcz, marchwi, selera i warzyw zielonych, bogatych w luteinę, chroni przed rozwojem raka okrężnicy (16). Utrzymywanie w organizmie równowagi oksydacyjno/antyoksydacyjnej jest bardzo ważne dla prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego, utrzymania struktury i funkcji błon lipidowych, konformacji białek i kwasów nukleinowych oraz kontroli przekazywania sygnałów w komórce i ekspresji genów.

Literatura

1. Oliński R., Jurgowiak M., (1996), w: *Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie*, red. A. Barciszewski, K. Łastowski, T. Twardowski, 373-400, Wyd. Sorus, Poznań.
2. Halliwell B., (1996), *Annu. Rev. Nutr.*, 16, 33-50.
3. Oliński R., Jurgowiak M., (1999), *Post. Biochem.*, 45, 50-58.
4. Oldham K. M., Bowen P. E., (1998), *J. Am. Diet. Assoc.*, 98, 1001-1008.
5. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W., (1994), *Biochemia Harpera*, PZWL, 824-841.
6. Sikora E., (1989), *Post. Biochem.*, 35, 563-574.
7. Bartosz G., (1995), *Druga twarz tlenu*, PWN, Warszawa.
8. Sies H., Stahl W., (1995), *Am. J. Clin. Nutr.*, 62 (suppl), 1315S-1321S.
9. van Poppel G., Berg H., (1997), *Cancer Lett.*, 114, 195-202.
10. Schwartz C. J., Valente A. J., Spragne E. A., (1993), *Am. J. Cardiol.*, 71, 9-14.

11. 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), *J. Sci. Food Agric.*, 80, 913-938.
12. van den Berg H., Faulks R., Granado H. F., Hirschberg J., Olmedilla B., Sandmann G., Southon S., Stahl W., (2000), *J. Sci. Food Agric.*, 80, 880-912.
13. Rahden-Staroń I., (1990), *Post. Biochem.*, 36, 16-22.
14. Hennekens C. H., (1994), *Am. J. Med.*, 97, 2-4, 22, 28.
15. Mayne S. T., (1996), *FASEB J.*, 10, 690-701.
16. Slattery M. L., Benson J., Curtin K., Ma K., Schaeffer D., Potter J. D., (2000), *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 575-582.
17. Böhm F., Tinkler J. H., Truscott T. G., (1995), *Nat. Med.*, 1, 98-99.
18. Sharoni Y., Danilenko M., Levy J., (2000), *Drug Dev. Res.*, 50, 448-456.
19. Priemé H., Loft S., Nyssönen K., Salonen J. T., Poulsen H. E., (1997), *Am. J. Clin. Nutr.*, 65, 503-507.
20. Stahl W., Heinrich U., Weisman S., Eichler O., Sies H., Tronnier H., (2001), *J. Nutr.*, 131/5, 1449-1451.
21. Visioli F., Romani A., Mulinacci N., Zarini S., Coute D., Vincieri F. F., Galli C., (1999), *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3397-3401.
22. Wang M., Li J., Raugaraj M., Shas Y., La Voie E. J., Huang T. Ch., Ho Ch. T., (1998), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4869-4873.
23. Demkowicz-Dobrzański K., Hennig E. E., (1992), *Post. Biochem.*, 38, 37-42.
24. Mifflin B. J., (2000), *Plant Physiol.*, 123, 17-28.
25. NEDDIET Factsheet, September 2000, A Concerted Action Project Funded by the European Union 1997-2001, Project CT96-3052.
26. Römer S., Fraser P. D., Kiano J. W., Shipton C. A., Misawa N., Schuch W., Bramley P. M., (2000), *Nat. Biotech.*, 18, 666-669.
27. Bloom F., (2000), *Science*, 288, 973.
28. Schiermeier Q., (2001), *Nature*, 409, 551.
29. DellaPenna D., (2001), *Plant Physiol.*, 125, 160-163.
30. Wurtzel E. T., Luo R., Yatou O., (2001), *J. Exp. Bot.*, 52, 161-166.
31. Fields M., Lewis C. G., Bureau J., (2001), *Metab. Clin. Exp.*, 5, 558-561.
32. Lin Ch. J., Lee J. L., Duan K. J., Ken Ch. F., (2000), *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4444-4447.
33. Leo M. A., Lieber Ch. S., (1999), *Am. J. Clin. Nutr.*, 69, 1071-1085.
34. Russel R. M., (2000), *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 878-884.