

Uniwersytet Jagielloński  
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Jolanta Gruszka

**Antyoksydacyjne działanie lipidów prenylowych  
w badaniach *in vitro* oraz *in vivo***

Praca doktorska przygotowana pod kierunkiem dr hab. Jerzego Kruka  
w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin

Kraków 2010

*Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi Panu dr hab. Jerzemu Krukowi za opiekę naukową, poświęcony czas, wyrozumiałość, cierpliwość oraz cenne uwagi na każdym etapie powstawania tej pracy.*

*Dziękuję Pani dr Annie Pawlak i dr Agnieszce Broniec z Zakładu Biofizyki za pomoc podczas przeprowadzania pomiarów fosforescencji tlenu singletowego oraz w czasie analizy danych.*

*Pragnę podziękować wszystkim pracownikom i doktorantom Zakładu Fizjologii i Biochemii Roślin za możliwość wykonywania pracy w miłej i życzliwej atmosferze, oraz za wszelką okazaną pomoc.*

## Spis treści

<b>1.Wstęp</b> .....	8
1.1. Charakterystyka badanych lipidów prenylowych.....	8
1.1.1.Tokoferole i tokotrienole .....	8
1.1.2.Plastochromanol .....	15
1.1.3.Plastochinon-9.....	16
1.1.4.Ubichinon-10.....	17
1.1.5.α-Tokoferylochion.....	20
1.2. Reaktywne formy tlenu .....	21
1.3. Miejsca generacji reaktywnych form tlenu w komórce roślinnej.....	25
1.4. Uszkodzenia komórki powodowane przez reaktywne formy tlenu .....	30
1.5. Mechanizmy obronne komórki przed reaktywnymi formami tlenu .....	32
1.6. Udział w przekazywaniu sygnałów w komórce - drugie oblicze reaktywnych form tlenu .....	35
1.7. Cel pracy.....	36
<b>2.Materiały i metody</b> .....	37
2.1. Odczynniki.....	37
2.2. Aparatura .....	38
2.3. Lipidy prenylowe .....	38
2.3.1.Izolacja preparatywna PC .....	39
2.4. Roztwory wzorcowe.....	40
2.5. Analiza zawartości chromanoli w olejach roślinnych.....	41
2.6. Wyznaczanie stałych szybkości wygaszania tlenu singletowego ( $k_Q$ ) przez badane lipidy prenylowe metodą rozdzielczej czasowo fosforescencji tlenu singletowego...	42
2.7. Izolacja i identyfikacja produktów reakcji lipidów prenylowych z $^1O_2$ .....	43
2.8. Detekcja $^1O_2$ z wykorzystaniem 6-difenylo-1,3,5-heksatrienu (DPH).....	43
2.9. Detekcja $^1O_2$ w komórkach <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> za pomocą DPH oraz oznaczanie poziomu lipidów prenylowych w jego komórkach.....	44
2.9.1.Warunki hodowli .....	44
2.9.2.Przebieg eksperymentu .....	45
2.9.3.Oznaczenie stężenia chlorofilu i pomiar fluorescencji DPH .....	45
2.9.4.Oznaczenie zawartości lipidów prenylowych.....	46
2.10.Oznaczenie zawartości lipidów prenylowych w czasie stresu świetlnego w komórkach <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> w obecności $D_2O$ .....	46

2.11. Badanie wytwarzania anionorodnikarodnika ponadtlenkowego w reakcji komórek <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> na stres świetlny przy użyciu tetranitrometanu (TNM).....	47
2.12. Oznaczanie puli plastochinonów błonowych i pozabłonowych w komórkach <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	48
2.13. Badanie zdolności hamowania peroksydacji lipidów przez lipidy prenylowe .....	49
2.13.1. Pomiary wykorzystaniem AAPH .....	49
2.13.2. Pomiary z wykorzystaniem AMVN .....	50
<b>3. Wyniki</b> .....	52
3.1. Zawartość chromanoli w olejach roślinnych .....	52
3.2. Preparatyka plastochromanolu.....	55
3.3. Stałe szybkości wygaszania tlenu singletowego ( $k_Q$ ) badanych lipidów prenylowych.....	57
3.4. Charakterystyka produktów reakcji badanych lipidów prenylowych z tlenem singletowym.....	60
3.5. Detekcja tlenu singletowego z wykorzystaniem 6-difenyl-1,3,5-heksatrienu (DPH) .....	68
3.5.1. Detekcja tlenu singletowego w układzie <i>in vitro</i> .....	69
3.5.2. Detekcja tlenu singletowego w układzie <i>in vivo</i> .....	71
3.6. Analiza zawartości lipidów prenylowych w komórkach <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> w czasie stresu świetlnego oraz w obecności $D_2O$ .....	75
3.7. Badanie udziału anionorodnika ponadtlenkowego w reakcji komórek <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> na stres świetlny przy zastosowaniu tetranitrometanu (TNM).....	79
3.8. Badanie zdolności hamowania procesu peroksydacji lipidów przez lipidy prenylowe .....	82
3.8.1. Inicjacja reakcji peroksydacji przy użyciu AAPH .....	83
3.8.2. Inicjacja reakcji peroksydacji przy użyciu AMVN .....	87
<b>4. Dyskusja</b> .....	93
4.1. Dystrybucja chromanoli w olejach roślinnych .....	93
4.2. Lipidy prenylowe jako efektywne wygaszacze tlenu singletowego .....	94
4.3. Produkty reakcji lipidów prenylowych z tlenem singletowym .....	97
4.4. Udział $\alpha$ - tokoferolu i plastochinonu w odpowiedzi na stres świetlny u <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	99

4.5. Udział lipidów prenylowych w hamowaniu reakcji peroksydacji błon liposomów .	100
<b>5.Wnioski</b> .....	103
<b>6.Streszczenie</b> .....	104
<b>7.Literatura</b> .....	106

## Wykaz stosowanych skrótów

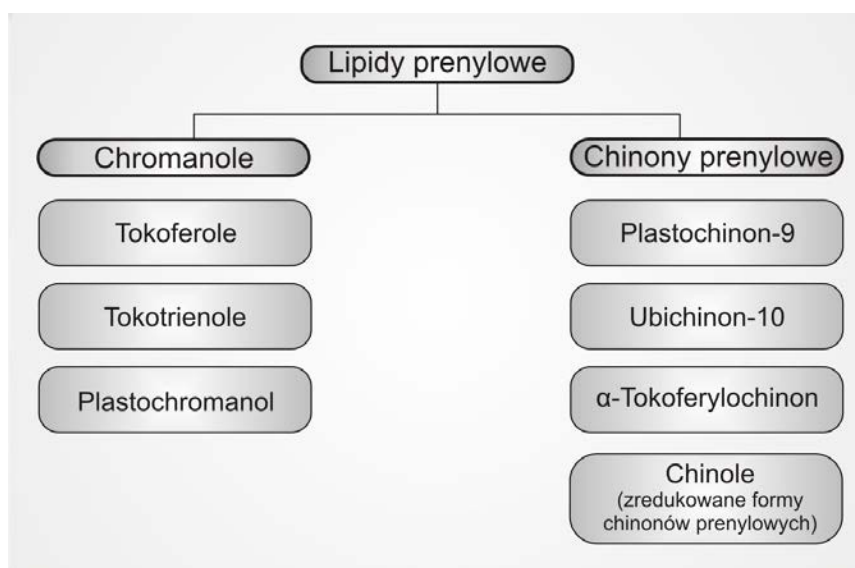
<b><math>\cdot\text{OH}</math></b>	– rodnik hydroksylowy
<b><math>^1\text{O}_2</math></b>	– tlen singletowy
<b><math>^3\text{Chl}</math></b>	– chlorofil trypletowy
<b>AAPH</b>	– 2,2' –azo-bis(2-amidynopropan)
<b>AMVN</b>	– 2,2' –azo-bis(2,4-dimetylowaleronitryl)
<b>AOX</b>	– oksydaza alternatywna
<b>Asc</b>	– kwas askorbinowy (wiamina C)
<b>Asc<math>\cdot</math></b>	– rodnik askorbylowy
<b>ATP</b>	– adenozynotrifosforan
<b>Chl</b>	– chlorofil
<b>D<sub>2</sub>O</b>	– ciężka woda (tlenek deuteru)
<b>DGDG</b>	– digalaktozylodiacyloglicerol
<b>Fd</b>	– ferredoksyna
<b>FR</b>	– wolne rodniki (ang. <b>free radicals</b> )
<b>HGA</b>	– kwas homogentyzynowy
<b>HOO<math>\cdot</math>/HO<sub>2</sub><math>\cdot</math>/HO<sub>2</sub><math>\cdot</math></b>	– rodnik wodoronadtlenkowy
<b>HPLC</b>	– wyskociśnieniowa chromatografia cieczowa
<b>JA</b>	– kwas jasmonowy
<b>k<sub>Q</sub></b>	– stała szybkości wygaszania tlenu singletowego
<b>LH</b>	– kwas tłuszczowy
<b>LHC</b>	– kompleks zbierający energię świetlną (ang. <b>light harvesting complex</b> )
<b>LOOH</b>	– nadtlenek kwasu tłuszczowego
<b>MGDG</b>	– monogalaktozylodiacyloglicerol
<b>O<sub>2</sub><math>\cdot^-</math></b>	– anionorodnik ponadtlenkowy
<b>OEC</b>	– kompleks utleniający wodę
<b>PC</b>	– plastochromanol
<b>PCy</b>	– plastocyjanina
<b>PG</b>	– fosfatydyloglicerol
<b>PPP</b>	– pirofosforan fitylu
<b>PQ-9</b>	– plastochinon-9
<b>PQH<sub>2</sub>-9</b>	– plastochinol-9
<b>PS I</b>	– fotosystem I

<b>PS II</b>	– fotosystem II
<b>PUFA</b>	– wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. <b>polyunsaturated fatty acids</b> )
<b>R•/L•</b>	– rodnik alkilowy/rodnik alkilowy kwasu tłuszczowego
<b>Rb</b>	– róż bengalski
<b>RFT</b>	– reaktywne formy tlenu
<b>RO•/LO•</b>	– rodnik alkoksylowy/ rodnik alkoksylowy kwasu tłuszczowego
<b>ROO•/LOO•</b>	– rodnik nadtlenkowy/ rodnik nadtlenkowy kwasu tłuszczowego
<b>SQDG</b>	– sulfochinowozyliodiacyloglicerol
<b>TLC</b>	– chromatografia cienkowarstwowa
<b>TNM</b>	– tetranitrometan
<b>TO•</b>	– rodnik tokoferoksylowy
<b>Toc</b>	– tokoferol
<b>TPP</b>	– 5,10,15,20-tetrafenylo-21H,23H-porfina
<b>Tt</b>	– tokotrienol
<b>TtO•</b>	– rodnik tokotrienoksylowy
<b>UQ•-10</b>	– anionorodnik ubisemichinonowy
<b>UQ-10</b>	– ubichinon-10
<b>UQH•-10</b>	– rodnik ubisemichinonowy
<b>UQH<sub>2</sub>-10</b>	– ubichinol-10
<b>Zn-TPP</b>	– 5,10,15,20-tetrafenylo-21H,23H-porfina cynkowa
<b>α-TOOH</b>	– 8α-wodoronadtlenek-α-tokoferolu
<b>α-TQ</b>	– α-tokoferylochinon
<b>α-TQH<sub>2</sub></b>	– α-tokoferylochinol

### 1. Wstęp

#### 1.1. Charakterystyka badanych lipidów prenylowych

Lipidy prenylowe to grupa niepolarnych, drobnocząsteczkowych związków o podstawowym znaczeniu w metabolizmie roślin, zwierząt i człowieka. Wśród nich wyróżniamy chromanole obejmujące tokoferole (Toc), tokotrienole (Tt), plastochromanol (PC) oraz tzw. chinony prenylowe, do których zaliczamy związki takie jak ubichinon (UQ-10), plastochinon (PQ-9),  $\alpha$ -tokoferylochinon ( $\alpha$ -TQ) oraz, stanowiące ich zredukowane formy, chinole prenylowe: ubichinol-10 (UQH<sub>2</sub>-10), plastochinol-9 (PQH<sub>2</sub>-9),  $\alpha$ -tokoterylochinol ( $\alpha$ -TQH<sub>2</sub>). Podział badanych związków przedstawiono na schemacie poniżej (Rys. 1):



**Rys. 1.** Schemat ilustrujący przynależność badanych związków do poszczególnych grup lipidów prenylowych.

##### 1.1.1. Tokoferole i tokotrienole

Tokoferole i tokotrienole stanowią szeroko rozpowszechnioną w przyrodzie grupę tokochromanoli. Znane są cztery związki z grupy tokoferoli ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokoferol) oraz cztery analogiczne tokotrienole ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokotrienol). Szereg z nich stanowi ważny składnik naszej codziennej diety i określany jest mianem witaminy E.

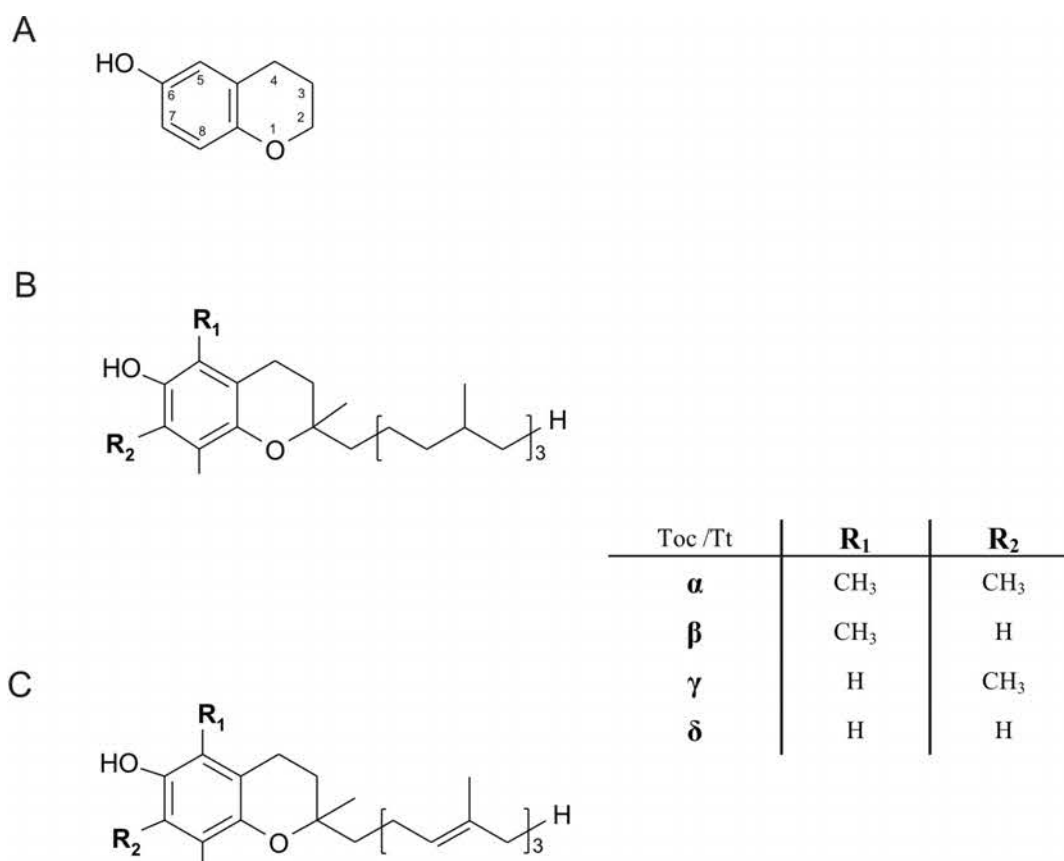
Witamina E została odkryta w 1922 roku na Uniwersytecie Kalifornijskim przez Evans'a i Bishop'a, jako czynnik zapewniający prawidłową reprodukcję u szczurów i z racji pełnionej



## 1. Wstęp

funkcji nazwana tokoferolem od greckich słów: *tokos* - potomstwo i *phero* - niosę, rodzę. Termin witamina E został wprowadzony nieco później, bo w 1924 roku przez Sure'a (Dörmann, 2007). W 1936 roku Evans i jego współpracownicy po raz pierwszy wyizolowali witaminę E z oleju uzyskanego z kielków pszenicy, natomiast dwa lata później Fernholz określił strukturę chemiczną tokoferolu (Dörmann, 2007).

Ze względu na budowę cząsteczki, Toc i Tt wykazują charakter amfipatyczny. Związki te zbudowane są z pierścienia chromanolowego (grupa OH w pozycji 6), stanowiącego polarną część ich cząsteczki oraz hydrofobowego, węglowodorowego łańcucha bocznego złożonego z 16 atomów węgla. W cząsteczkach Toc łańcuch ten ma charakter nasycony, natomiast w przypadku Tt zawiera on trzy wiązania podwójne w pozycjach 3', 7' i 11'. Występujące w przyrodzie tokoferole i tokotrienole ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -) różnią się między sobą ilością oraz położeniem grup  $\text{CH}_3$ - w pierścieniu chromanolowym (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996; Munné-Bosch i Alegre, 2002; Schneider, 2005; Dörmann, 2007) (Rys. 2).



Rys. 2. Wzory strukturalne 6-chromanolu (A), tokoferoli (B) oraz tokotrienoli (C).

## 1. Wstęp

---

W cząsteczce  $\alpha$ -Toc, jak również pozostałych tokoferoli, występują trzy centra chiralne w pozycjach 2, 4', i 8', stąd też każdy z tych związków może występować w formie 8 optycznie czynnych izomerów. Naturalnie występujące izomery Toc wykazują konfigurację R we wszystkich trzech pozycjach. Cząsteczki Tt posiadają jedno centrum asymetrii w pozycji 2, natomiast obecność wiązań podwójnych w łańcuchu bocznym stwarza możliwość tworzenia izomerów geometrycznych w pozycjach 3' i 7'. Naturalnie występujące Tt wykazują konfigurację 2-R, 3'- *trans*, 7'- *trans* (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996; Munné-Bosch i Alegre, 2002; Schneider, 2005; Dörmann, 2007).

Tokoferole i tokotrienole syntetyzowane są w komórkach roślin wyższych, glonów oraz sinic. Obecności tokoferoli nie stwierdzono jedynie w komórkach sinicy *Anacyctis nidulans* (Munné-Bosch i Alegre, 2002).

Prekursorami biosyntezy tokochromanoli jest wywodzący się z cytozolowego szlaku kwasu szikimowego kwas homogentyzynowy (HGA) oraz pochodzący z plastydowego szlaku syntezy poliizoprenoidów, pirofosforan izopentenylu. W wyniku kolejnych kondensacji z pięciowęglowego pirofosforanu izopentenylu tworzy się dwudziestowęglowy pirofosforan geranylogeranylu (GGPP), który bierze udział w syntezie Tt. Natomiast synteza Toc przebiega z udziałem pirofosforanu fitylu (PPP) powstającego poprzez redukcję GGPP (Dörmann, 2007; Mène-Saffrané i DellaPenna, 2009).

Obecność Toc stwierdzono we wszystkich organach roślinnych, gdzie ich zawartość wykazuje znaczne różnice. Najwyższą zawartością Toc charakteryzują się nasiona roślin oleistych, gdzie ich poziom waha się w zakresie 0,5-2 mg/g oleju (DellaPenna, 2005). Niższe zawartości Toc występują w liściach (300-500  $\mu$ g/g świeżej masy), z wyjątkiem palmy olejowej (10-50  $\mu$ g/g świeżej masy) (Grusak i DellaPenna, 1999), kilku gatunków roślin tropikalnych (Ching i Mohamed, 2001) i liści *Eucalyptus gunni*, gdzie ta zawartość wynosi blisko 1 mg/g świeżej masy (El Kayal i in., 2006). Także udział poszczególnych izomerów w różnych tkankach roślinnych wykazuje duże zróżnicowanie. W liściach dominującą formę stanowi  $\alpha$ -Toc z pewnymi wyjątkami, jak w przypadku sałaty, szpinaku (DellaPenna, 2005), żyworódki pierzastej (*Kalanchoe daigremontiana*), młodych liści klonu (Szymańska i Kruk, 2008a) i fasoli (*Phaseolus coccineus*) (Szymańska i Kruk, 2008b) oraz pędów kianiek (*Cuscuta*) (van der Kooij, 2005; Szymańska i Kruk, 2008a), gdzie dominują izomery  $\gamma$ - bądź  $\delta$ -Toc. Natomiast w przypadku nasion stwierdzono największą zawartość  $\gamma$ -tokoferolu (Grusak i DellaPenna, 1999). Jeden z gatunków kianianki *C. japonica*, charakteryzuje brak  $\alpha$ - i  $\beta$ -tokoferolu, zaś formę dominującą stanowi  $\delta$ -Toc (van der Kooij, 2005).

Tt zwykle nie występują w zielonych częściach roślin. Największe ich ilości stwierdzono w nasionach niektórych gatunków roślin, głównie jednoliściennych (Horvath, 2006). Najbogatszym źródłem Tt jest olej z otrębów ryżu (Ong, 1993; Packer i in., 2001). Dużą zawartość Tt stwierdzono także w oleju z kielków pszenicy (Balz i in., 1992; Ong, 1993; Packer i in., 2001), kokosu (Ong, 1993; Packer i in., 2001, Chun i in, 2006) i nasion liczi chińskiego (Matthäus i in., 2003). Obecność Tt stwierdzono także w komórkach *Hevea brasiliensis* wyspecjalizowanych w produkcji kauczuku (Horvath, 2006).

W obrębie komórki Toc i Tt zlokalizowane są głównie w plastydach. Ich obecność stwierdzono w amyloplastach bulw i nasion, chloroplastach tkanek fotosyntetyzujących, otoczce chloroplastów, leukoplastach płatków oraz chromoplastach owoców. Znane są także doniesienia o wykryciu  $\alpha$ -tokoferolu w wakuolach liści jęczmienia oraz błonach mikrosomalnych korzeni soi. Jednakże dane dotyczące pozaplastydowej lokalizacji  $\alpha$ -tokoferolu wymagają weryfikacji (Munné-Bosch i Alegre, 2002).

W obrębie chloroplastów stwierdzono występowanie  $\alpha$ -tokoferolu w otoczce chloroplastowej, gdzie zachodzi biosynteza tego związku, w plastoglobulach, gdzie magazynowany jest jego nadmiar oraz w błonach tylakoidów (Munné-Bosch i Alegre, 2002).

Jedną z najważniejszych biologicznych funkcji jaką pełnią Toc i Tt w komórce jest ich działanie antyoksydacyjne, które polega głównie na zmiataniu wolnych rodników powstających w wyniku peroksydacji lipidów oraz terminacji tej reakcji (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996; Bramley, 2000; Munné-Bosch i Alegre, 2002; Schneider, 2005).

Antyoksydacyjne właściwości Toc i Tt związane są z obecnością w ich cząsteczkach grupy OH w pozycji C-6 w pierścieniu chromanolowym i zdolnością do przekazywania wodoru fenolowego na cząsteczkę wolnego rodnika (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996; Munné-Bosch i Alegre, 2002). Na efektywność antyutleniającego działania Toc i Tt wpływają także stopień metylacji pierścienia aromatycznego ( $\alpha > \beta = \gamma > \delta$ ), rozmiar pierścienia heterocyklicznego, oraz długość łańcucha bocznego. Stopień nienasycenia łańcucha prenylowego, który odróżnia Toc i Tt, przypuszczalnie także może wywierać wpływ na ich własności antyoksydacyjne, ponieważ wpływa on na rozpuszczalność cząsteczki w błonie a tym samym na stopień jej związania z błoną. Im większe nienasycenie łańcucha, tym lepsza rozpuszczalność cząsteczki (Munné-Bosch i Alegre, 2002).

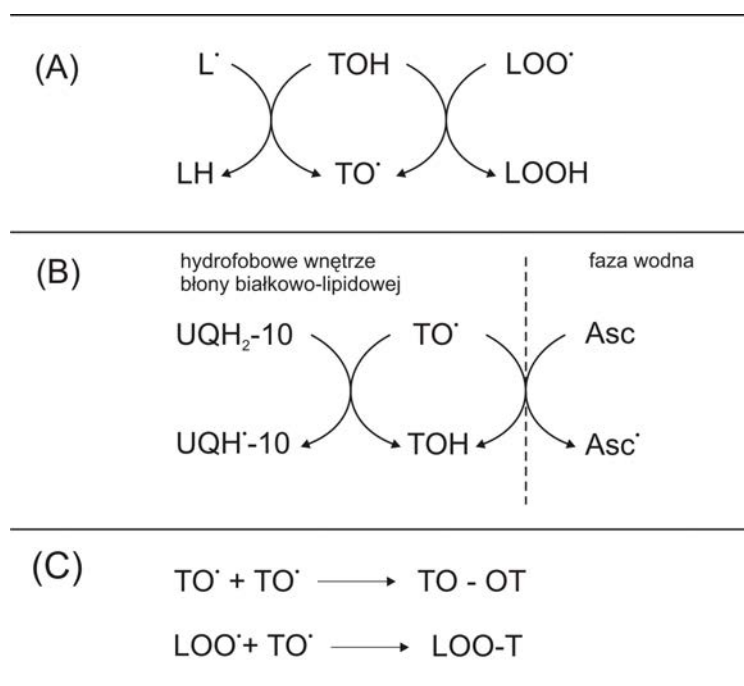
Antyoksydacyjne działanie Toc i Tt polega na ich reakcji z rodnikami nadtlenkowymi powstającymi w wyniku reakcji peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA). Toc i Tt zmiatają rodniki nadtlenkowe ( $\text{LOO}^\bullet$ ) zanim zdołają one wejść w reakcję z kolejną cząsteczką lipidu. Mechanizm tej reakcji polega na odłączeniu od cząsteczki Toc bądź Tt

## 1. Wstęp

atomu wodoru od grupy OH obecnej w ich pierścieniu chromanolowym i przeniesieniu go na  $\text{LOO}^\bullet$ . W ten sposób dochodzi do neutralizacji rodnika lipidowego (tworzy się odpowiedni nadtlenek), zaś cząsteczki Toc i Tt przechodzą w rodniki tokoferoksyłowe ( $\text{TO}^\bullet$ ) lub tokotrienoksyłowe ( $\text{TtO}^\bullet$ ) (Munné-Bosch i Alegre, 2002; Munné-Bosch, 2005).

Rodniki te ze względu na małą reaktywność nie uczestniczą w dalszej prolongacji reakcji peroksydacji. Ich neutralizacja może zachodzić na kilka sposobów. Mogą zostać zredukowane poprzez inne antyoksydanty (kwas askorbinowy, ubichinol) i w ten sposób zregenerowane do formy wyjściowej. Do terminacji reakcji peroksydacji może dojść również na drodze reakcji dwóch rodników  $\text{TO}^\bullet$  lub  $\text{TtO}^\bullet$  z wytworzeniem dimeru, bądź przyłączenia rodnika  $\text{TO}^\bullet$  lub  $\text{TtO}^\bullet$  do kolejnego rodnika nadtlenkowego z utworzeniem adduktu (Munné-Bosch i Alegre, 2002; Niki i Noguchi, 2004; Schneider, 2005).

W warunkach niskiego stężenia tlenu i znikomej dostępności  $\text{LOO}^\bullet$ , Toc mogą bezpośrednio wchodzić w reakcje z  $\text{L}^\bullet$  (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996). Udział Toc w hamowaniu reakcji peroksydacji przedstawiono na Rys. 3:



**Rys. 3.** Udział tokoferolu w przerywaniu reakcji peroksydacji: (A) – zmiatanie wolnych rodników z utworzeniem rodnika tokoferoksyłowego ( $\text{TO}^\bullet$ ) i neutralizacja  $\text{TO}^\bullet$  na drodze: (B) – regeneracji  $\text{TO}^\bullet$  przy udziale ubichinolu-10 ( $\text{UQH}_2\text{-10}$ ) lub askorbinianu ( $\text{Asc}$ ) oraz (C) – rekombinacji  $\text{TO}^\bullet$  lub addycji  $\text{TO}^\bullet$  do  $\text{LOO}^\bullet$  (rodnik nadtlenkowy). TOH – tokoferol,  $\text{UQH}^\bullet\text{-10}$  – rodnik ubisemichinonowy,  $\text{L}^\bullet$  - rodnik alkilowy,  $\text{Asc}^\bullet$  - rodnik askorbyłowy.

Aktywność antyoksydacyjna poszczególnych izomerów Toc i Tt *in vivo* maleje w następującym porządku:  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ , natomiast w warunkach *in vitro* może być inna (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996).

Tokoferole i tokotrienole biorą też udział w ochronie komórek przed szkodliwym działaniem tlenu singletowego ( $^1\text{O}_2$ ). Toc neutralizują tę RFT bądź poprzez jego fizyczne wygaszanie, bądź też na drodze chemicznej, poprzez bezpośrednią z nim reakcję. W pierwszym przypadku dezaktywacja  $^1\text{O}_2$  następuje w wyniku przekazania energii wzbudzenia na cząsteczkę antyoksydanta (Toc lub Tt) (Munné-Bosch i Alegre, 2002). Jedna cząsteczka Toc jest w stanie zdezaktywować do 40-120 cząsteczek  $^1\text{O}_2$  zanim sama ulegnie utlenieniu (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996). Natomiast w wyniku reakcji chemicznej Toc i Tt z  $^1\text{O}_2$ , dochodzi do powstania tokoferylochinonów oraz ich epoksydów (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996; Munné-Bosch i Alegre, 2002). Wyniki przeprowadzonych badań (Kruk i Strzałka, 1995a) wykazały, że  $\alpha$ -TQ, powstający w wyniku reakcji  $\alpha$ -Toc z  $^1\text{O}_2$ , może być przekształcany na drodze enzymatycznej do  $\alpha$ -tokoferylochinolu ( $\alpha$ -TQH<sub>2</sub>), który również posiada właściwości przeciwutleniające oraz zdolność do regeneracji  $\alpha$ -Toc (Kruk i in., 1997a, Mukai i in., 1992).

Niezależnie od dobrze udokumentowanych właściwości antyoksydacyjnych Toc, na podstawie wyników badań *in vitro* dotyczących autooksydacji ludzkich lipoprotein LDL (lipoprotein o małej gęstości), które wykazały że peroksydacja lipidów w LDL zachodziła znacznie szybciej w obecności Toc, sugerowano że Toc może działać także jako prooksydant (Inglod i in., 1993). Jednak późniejsze tego typu badania, z zastosowaniem warunków bardziej zbliżonych do fizjologicznych, poddały w wątpliwość wcześniejsze hipotezy (Bernard i in., 2001).

Prooksydacyjnego działania Toc dopatrywano się także w jego zdolnościach redukcyjnych. Silne zdolności redukcyjne z jednej strony warunkują antyoksydacyjne zdolności każdego antyoksydanta (redukcja rodników nadtlenkowych do ich wodoronadtlenków), z drugiej umożliwią także redukcję jonów metali przejściowych ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) do ich prooksydacyjnej formy ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ). Taki efekt obserwowano w przypadku Asc. Zachodzenie tego typu reakcji w warunkach *in vitro* obserwowano także w przypadku Toc. (Yamashita i in., 1998; Burkitt, 2001). Jednakże możliwość zachodzenia analogicznej reakcji *in vivo* pozostaje dyskusyjna chociażby z tego powodu, że w komórce jony tych metali są zwykle skompleksowane z białkami (Niki i Noguchi, 2004; Schneider, 2005; Gille i in., 2008).

Poza działaniem antyutleniającym, Toc i Tt pełnią także szereg innych funkcji. Funkcje te związane są przede wszystkim z wpływem na aktywność enzymów, kaskady sygnałowe oraz regulację ekspresji genów.

W komórkach zwierzęcych  $\alpha$ -Toc bierze udział w regulacji aktywności różnych enzymów zaangażowanych w przekazywanie sygnałów (Azzi i Stocker, 2000; Azzi i in., 2002; Rimbach i in., 2002; Zingg, 2007; Brigelius-Flohé, 2009). Jest aktywatorem fosfatazy

## 1. Wstęp

---

fosfoseryno-treoninowej 2A (PP2A), białkowej fosfatazy fosfotyrozynowej (PTP), alfa-kinazy diacyloglicerolu (DAGK $\alpha$ ), fosfolipazy A2 (PLA2) oraz cyklooksyzgenazy (COX-2). Natomiast działanie hamujące wykazuje w stosunku do kinaz białkowych C alfa i delta (PKC $\alpha$  i PKC- $\delta$ ), kinazy białkowej B (PKB), fosfolipazy A2 (PLA2), białkowej kinazy tyrozynowej (PTK), cyklooksyzgenazy-2 (COX-2), 5-, 12- i 15-lipooksyzgenazy (5-, 12- i 15-LOX), oksydazy NADPH (poprzez inhibicję PKC) oraz kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny (MAPK).

Toc uczestniczą także w regulacji ekspresji genów. U roślin wykazano udział Toc w przekazywaniu sygnałów międzykomórkowych poprzez modulację poziomu kwasu jasmonowego (JA) (Munné-Bosch i Falk, 2004; Munné-Bosch i in., 2007).  $\alpha$ -Toc poprzez kontrolę poziomu RFT oraz stopnia peroksydacji lipidów w chloroplastach, reguluje poziom nadtlenków będących prekursorami syntezy JA. Kwas jasmonowy jest fitohormonem regulującym ekspresję genów jądrowych, który m. in. pełni funkcję inhibitora wzrostu, wpływa na fotosyntezę, metabolizm antocyjanów i tokoferoli (Creelman i Mullet, 1997). Zatem  $\alpha$ -Toc regulując poziom JA, tym samym pośrednio wpływa na aktywność genów jądrowych.

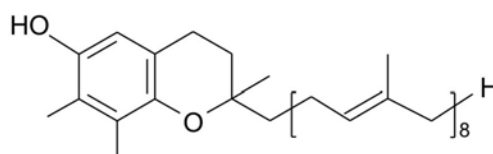
Badania przeprowadzone na mutancie kukurydzy i transgenicznym ziemniaku wykazały, że Toc bierze udział w transporcie węglowodanów z liści do floemu (Hofius i Sonnenwald, 2003; Dörmann, 2007; Munné-Bosch, 2007). Obniżonej zawartości Toc w komórkach tych roślin, towarzyszyła akumulacja sacharozy, skrobi oraz antocyjanin w liściach, a także nieprawidłowa budowa plasmodesmów. Wpływ Toc na metabolizm węglowodanów i proces fotosyntezy pokazały także badania przeprowadzone na komórkach mutantu sinicy *Synechocystis sp.* (Dörmann, 2007; Munné-Bosch, 2007)

W komórkach zwierzęcych  $\alpha$ -Toc wpływa m.in. na geny kodujące białka, które uczestniczą w procesie apoptozy, wzroście komórek, adhezji komórek, reakcjach na stan zapalny, regulują cykl komórkowy, transkrypcję oraz metabolizm komórki w tym także metabolizm samej witaminy E (Azzi i Stocker., 2000; Brigelius-Flohé, 2009).

Wyniki niektórych badań wskazują, że również Tt spełniają szereg funkcji niezwiązanych z ich antyoksydacyjnym działaniem. Przeprowadzone badania wykazały, że  $\alpha$ -Tt m.in. pełni rolę przekaźnika sygnałów, regulując długość życia u *C. elegans*, obniża poziom cholesterolu, wykazuje właściwości neuroprotektcyjne i przeciwnowotworowe (Theriault i in., 1999; Packer i in., 2001; Sen i in., 2004, 2006, 2007).

### 1.1.2. Plastochromanol

Plastochromanol (PC) wraz z tokoferolami i tokotrienolami należy do grupy chromanoli. Związek ten jest naturalnie występującym homologiem  $\gamma$ -tokotrienolu, którego łańcuch boczny zbudowany jest z 8 jednostek izoprenowych (Rys. 4). PC syntetyzowany jest w komórkach roślinnych z plastochinolu (PQH<sub>2</sub>-9) przy udziale cyklazy tokoferolowej (ang. tocopherol cyclase), będącej kluczowym enzymem szlaku biosyntezy Toc (Kumar i in., 2005; Szymańska i Kruk, 2008, Szymańska i Kruk, 2010a).



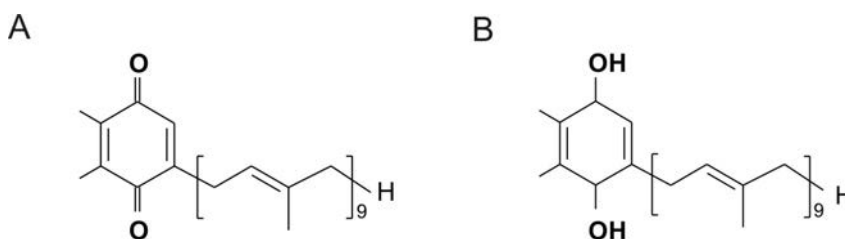
Rys. 4. Wzór strukturalny plastochromanolu.

Podobnie jak w przypadku tokotrienoli, najbogatszym źródłem PC są nasiona roślin oleistych. Najwyższą zawartość PC stwierdzono w nasionach lnu i rzepaku (Balz i in., 1992; Goffman i Möllers, 2000; Velasco i Goffman, 2000; Ahmed i in., 2005), w mniejszych ilościach obecny jest także w nasionach lnicznika (Zubr i Matthäus, 2002), konopii (Kreise i in., 2004), wielu gatunków roślin wietnamskich (Matthäus i in., 2003), szaławii (Bagci i Karaagaçli, 2004) i sosny czarnej (*Pinus nigra*) (Bagci i in., 2004). Występowanie PC stwierdzono także w liściach wielu gatunków roślin pochodzących z terenów Patagonii (Strzałka i in., 2009), *Arabidopsis thaliana* (Szymańska i Kruk, 2008) oraz *Hevea brasiliensis* (Whittle i in., 1965).

Ze względu na budowę chemiczną i miejsce występowania PC postuluje się, że podobnie jak Toc i Tt, posiada on właściwości antyoksydacyjne (Olejnik i in., 1997). Badania przeprowadzone na *Arabidopsis thaliana* wykazały, że jego poziom znacząco wzrastał w podczas starzenia się liści. Nieznaczny wzrost jego zawartości obserwowano także w czasie stresu świetlnego (Szymańska i Kruk, 2010a). Dodatkowo, identyfikacja hydroksylowych pochodnych PC w liściach u *Arabidopsis thaliana*, zarówno tych rosnących w warunkach słabego, jak i silnego światła oraz wzrost zawartości tych utlenionych pochodnych w warunkach stresu świetlnego i w czasie starzenia, może wskazywać na antyoksydacyjną aktywność PC *in vivo* (Szymańska i Kruk, 2010b). Rozpowszechnienie tego związku w różnych gatunkach roślin oleistych (olejach z tych roślin) oraz zdolności antyoksydacyjne PC były badane w ramach w niniejszej pracy.

### 1.1.3. Plastochinon-9

Plastochinon-9 (PQ-9) (Rys. 5A), zwany także PQ-A, jest chinonem prenylowym syntetyzowanym w komórkach organizmów o oksygenicznym typie fotosyntezy (rośliny wyższe, glony i sinice) (Kruk i Strzałka, 1995b; Jemioła-Rzemińska i Strzałka, 2005). Szlak biosyntezy tego związku jest częściowo wspólny dla szlaku syntezy Toc i Tt, gdyż prekursorem syntezy pierścienia aromatycznego PQ-9 jest kwas homogentyzynowy (HGA) (Bouvier i in., 2005). Badania przeprowadzone na mutantach *Synechocystis sp.* 6803 (Dähnhardt i in., 2002) i *Arabidopsis thaliana* (Norris i in., 1995), z upośledzonym szlakiem syntezy HGA (brakiem dioksygenazy p-hydroksybenzoesowej), wskazują na istnienie u *Synechocystis* szlaku syntezy PQ-9 niezależnego od HGA.



Rys. 5. Wzór strukturalny plastochinonu-9 (A) i plastochinolu-9 (B).

W obrębie komórki lokalizacja PQ-9 ogranicza się do chloroplastów, gdzie występuje on głównie w błonach tylakoidów pełniąc rolę przenośnika elektronów pomiędzy kompleksami białkowymi oraz protonów w poprzek błony (Jemioła-Rzemińska i Strzałka, 2005). Poza tylakoidami obecność PQ-9 stwierdzono także w otoczce chloroplastu będącej miejscem jego biosyntezy oraz w plastoglobulach stromy chloroplastu, gdzie gromadzony jest nadmiar PQ-9 (Kruk i Karpiński, 2006; Lichtenthaler, 2007).

Cząsteczki PQ-9 występujące w błonach tylakoidów charakteryzuje zróżnicowanie pod względem ich rozmieszczenia i pełnionych funkcji (Kruk i Strzałka, 1995b). Część cząsteczek PQ-9 jest trwale związana z białkami PSII (określane jako Q<sub>A</sub>), i bierze udział w przenoszeniu elektronów z feofityny na luźno związane cząsteczki PQ-9 (określane mianem Q<sub>B</sub>), które z kolei pośredniczą w transporcie elektronów pomiędzy Q<sub>A</sub> i tzw. wolną pulą PQ, również obecną w błonie tylakoidów. Cząsteczki puli PQ stanowią, pozostające w stanie równowagi, formę utlenioną (PQ-9) i zredukowaną (PQH<sub>2</sub>-9) (Rys. 5A, B). Plastochinon-9 jest również składnikiem kompleksu cytochromowego *b<sub>6</sub>f*, będącego miejscem utleniania PQH<sub>2</sub>-9, określanym jako miejsce Q<sub>Z</sub>.

Dodatkowo, w błonach tylakoidów zlokalizowano wiele innych miejsc utleniania-redukcji PQ-9 (Jemioła-Rzemińska i Strzałka, 2005). Między innymi, PQ-9 bierze udział w



## 1. Wstęp

---

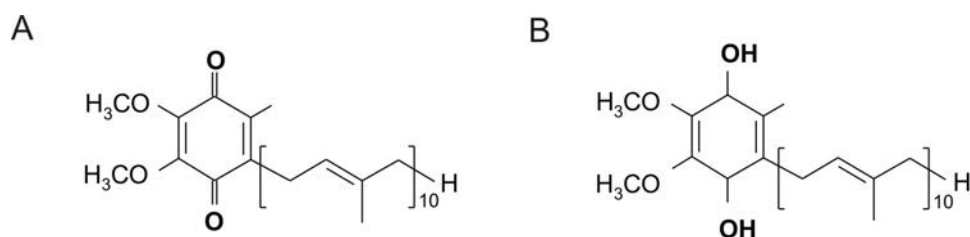
cyklicznym transporcie elektronów i chloroinspiracji oraz tzw. cyklu Q. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na sinicach, które z natury są niezdolne do syntezy UQ, wykazały że PQ w ich komórkach pełni rolę przenośnika elektronów zarówno w fotosyntetycznym, jak też oddechowym łańcuchu transportu elektronów w tej samej błonie (Hirano i in., 1980).

Podobnie jak tokochromanole, PQ w zredukowanej formie wykazuje właściwości antyoksydacyjne. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych zarówno w warunkach *in vitro* (Kruk i in., 1994.; Kruk i in., 1997), jaki i *in vivo* wskazują, że PQH<sub>2</sub>-9 skutecznie hamuje reakcję peroksydacji (Hundal i in., 1995; Maciejewska i in., 2000), jak również jest efektywnym zmiataczem anionorodnika ponadtlenkowego (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Kruk i in., 2003) i tlenu singletowego (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Kruk i Trebst, 2008).

Wiele badań wskazuje, że stan redoks puli PQ pełni rolę regulatora w odpowiedzi komórki na zmiany środowiskowe (Allen i in., 1981; Karpiński i in., 1997; Pfannschmidt i in., 1999; Pshybytko i in., 2008). PQ-9 bierze także udział w biosyntezie karotenoidów (Norris i in., 1995), z czym związana jest jego obecność nie tylko w zielonych tkankach roślin, ale także i w bulwach, korzeniach, cebulach, owocach, czy kwiatach (Nowicka i in., 2009).

### 1.1.4. Ubichinon-10

Ubichinon-10 (UQ-10), nazywany również koenzymem Q, Q<sub>10</sub>, lub CoQ, wraz ze zredukowaną jego formą, ubichnolem-10 (UQH<sub>2</sub>-10) (Rys. 6A, B), w obrębie komórki zlokalizowany jest głównie w mitochondriach (ich wewnętrznej błonie), gdzie pełni rolę przenośnika elektronów w łańcuchu oddechowym. W przypadku organizmów eukariotycznych, jego występowanie stwierdzono także w aparacie Golgiego, retikulum endoplazmatycznym, lizosomach, peroksysomach, mikrosomach i błonach komórkowych (Świeżewska i in., 1993; Ernster i Dallner, 1995; Soballe i Poole, 1999; Dallner i Sindelar, 2000; Turunen i in., 2004).



Rys. 6. Wzór strukturalny ubichinonu-10 (A) i ubichinolu-10 (B).

Cząsteczki UQ zbudowane są z pierścienia chinonowego, którego prekursorem u organizmów prokariotycznych jest p-hydroksybenzoesan, natomiast u organizmów eukariotycznych tyrozyna (Clarke, 2000) oraz bocznego łańcucha izoprenoidowego. Długość łańcucha bocznego jest różna u różnych grup organizmów, bądź u jednego organizmu występuje więcej niż jeden homolog UQ. Badany w tej pracy UQ-10, obecny jest u człowieka, roślin wyższych i niektórych mikroorganizmów (np. *Schistosaccharomyces pombe*) (Kawamukai i in., 2002).

W mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, UQ-10 bierze udział w przenoszeniu elektronów z kompleksu oksydoreduktazy NADH:ubichinon (kompleks I) i oksydoreduktazy bursztynian:ubichinon (kompleks II) na kompleks cytochromowy *bc<sub>1</sub>* (kompleks III). Kompleksy I i II powiązane są z kompleksem III tzw. mobilną pulą UQ, która może swobodnie dyfundować w błonie lipidowej. Przenoszenie przez UQ-10 elektronów pomiędzy poszczególnymi kompleksami i w cyklu Q (zachodzącym w obrębie kompleksu III) powiązane jest z transportem protonów w poprzek błony mitochondrialnej, czyli tworzeniem się tzw. gradientu protonowego, który następnie wykorzystywany jest do syntezy ATP (Soballe i Poole, 1999; Jemioła-Rzemińska i Strzałka, 2005).

UQ pełni także wiele innych funkcji niezwiązanych z procesem oddychania, uczestniczy on w pozamitochondrialnym transporcie elektronów (błony komórkowe, lizosomy), aktywacji mitochondrialnych białek rozprzegających i białkowych kinaz sygnałowych, moduluje ilość  $\beta$ 2-integrzyn na powierzchni monocytów krwi, a także bierze udział w tworzeniu mostków disiarczkowych (u bakterii), wpływa na właściwości fizykochemiczne błon komórkowych zapewniając ich stabilność (m.in. poprzez regulację przepuszczalności megakanałów w błonie mitochondrialnej (ang. mitochondrial permeability transition pores - MPTP)) oraz zapobiega dysfunkcji śródbłonna (poprze podwyższanie stężenia NO) (Crane i Navas, 1997; Turunen i in., 2004; Siemieniuk i Skrzydlewska, 2005).

Poza tym, UQ-10 wykazuje działanie antyoksydacyjne i prooksydacyjne (James i in., 2004). Zdolności te posiada zredukowana forma UQ-10 (UQH<sub>2</sub>-10) oraz rodnik ubisemichinonowy (UQH<sup>•</sup>-10) powstający w wyniku reakcji UQH<sub>2</sub>-10 z wolnymi rodnikami. Działanie antyoksydacyjne tego związku polega na hamowaniu reakcji peroksydacji lipidów (zarówno na etapie inicjacji, jak i propagacji), regeneracji  $\alpha$ -tokoferolu oraz zmiataniu rodnika ponadtlenkowego (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) i tlenu singletowego (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Frei i in., 1990; Mukai i in., 1993a; Ernster i Dallner; 1995; Kontush i in., 1995; Shi i in., 1999; Maroz i in., 2009).

Hamowanie peroksydacji lipidów zachodzi poprzez przekazanie atomu wodoru (H<sup>•</sup>) przez UQH<sub>2</sub>-10 na cząsteczkę wolnego rodnika (Rys. 7A), w wyniku czego następuje jego

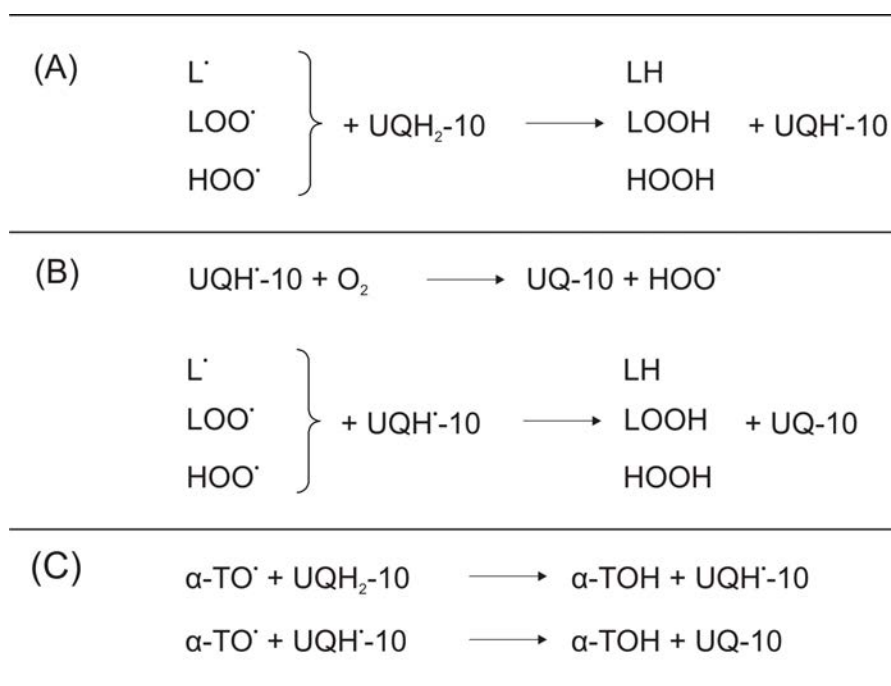
## 1. Wstęp

---

neutralizacja; natomiast sam ubichinol przechodzi w  $UQH^{\bullet}-10$ , który z kolei może reagować z tlenem cząsteczkowym ( $O_2$ ) lub innymi rodnikami, dając w efekcie cząsteczkę UQ-10 (Rys. 7B) (James i in., 2004).

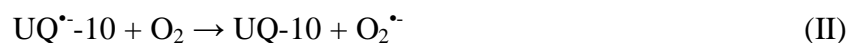
Ponieważ właściwości antyoksydacyjne posiada wyłącznie zredukowana forma UQ-10, dlatego tak ważne jest, aby w komórce możliwa była sprawna regeneracja tego związku do  $UQH_2-10$ . W mitochondriach wydajną regenerację  $UQH_2-10$  zapewnia sam łańcuch oddechowy. Natomiast regeneracja UQ-10 zlokalizowanego poza mitochondriami przebiega na drodze enzymatycznej, przy udziale enzymów, takich jak: reduktaza glutationowa, reduktaza tioredoksyny czy dehydrogenaza lipoamidowa (Turunen i in., 2004). Wchodząc w reakcje z wolnymi rodnikami,  $UQH_2-10$  zapobiega peroksydacji lipidów oraz oksydacyjnym modyfikacjom białek błonowych i DNA (Ernster i Dallner, 1995; Bentinger i in., 2007).

Natomiast regeneracja  $\alpha$ -Toc (Rys. 7C) polega na reakcji  $UQH_2-10$  oraz  $UQH^{\bullet}-10$  z rodnikiem  $\alpha$ -tokoferoksylowym ( $\alpha$ - $TO^{\bullet}$ ) z odtworzeniem  $\alpha$ -Toc w zredukowanej, wyjściowej formie ( $\alpha$ -TOH) (Kagan i in., 2000).



**Rys. 7.** Działanie antyoksydacyjne ubichinonu-10 (bezpośrednie – A, B; pośrednie – C) (James i in., 2004).

Poza aktywnością antyultleniającą UQ-10 działa także prooksydacyjnie poprzez wytwarzanie RFT, np.: w formie anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\bullet-}$ ) czy rodnika wodoronadtlenkowego ( $HOO^{\bullet}$ ). Właściwości prooksydacyjne wykazuje rodnik ubisemichnonowy ( $UQH^{\bullet}-10$ ) (równanie I) oraz, powstający w wyniku deprotonacji  $UQH^{\bullet}-10$  lub reakcji UQ-10/ $UQH_2-10$  z  $O_2^{\bullet-}$ , anionorodnik ubisemichinonowy ( $UQ^{\bullet-}-10$ ) (równanie II):

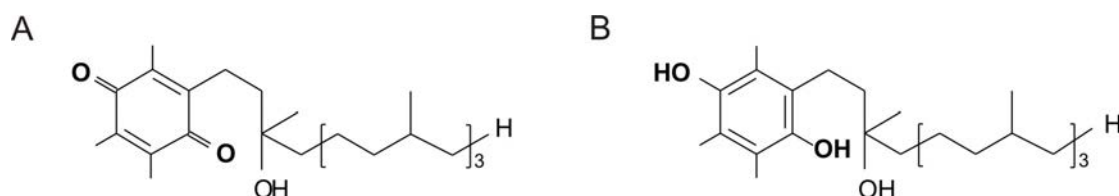


Powstałe przy ich udziale RFT mogą z kolei wchodzić w reakcje ze składnikami komórki prowadząc do ich uszkodzenia, bądź ulegać dalszym przekształceniom dając początek innym RFT, jak dzieje się w przypadku  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , który ulegając dysmutacji daje nadtlenek wodoru, ten zaś w wyniku dalszych przemian może tworzyć rodnik hydroksylowy ( $\bullet\text{OH}$ ) (James i in., 1995; Nohl i in.; 2003, Beteringer i in., 2007).

Warto podkreślić, że UQ-10 jest jedynym lipidowym związkiem o właściwościach atnyoksydacyjnych, który może być syntetyzowany w organizmie człowieka. UQ-10 jest niezwykle ważnym składnikiem w naszym organizmie, zapewniającym prawidłowe funkcjonowanie poszczególnych tkanek i narządów. Świadczy o tym choćby fakt, że jego niedobór w organizmie człowieka może prowadzić do rozwoju wielu chorób m.in.: choroby Alzheimera, Parkinsona, płasawicy Huntingtona, ataksji, niedoborze odporności, encefalopatii, nadciśnienia tętniczego, kardiomiopatii i różnego typu nowotworów (Muralikrishnanan i Jun, 2005; Crane, 2007, Nowicka i in., 2009).

### 1.1.5. $\alpha$ -Tokoferylochinon

$\alpha$ -Tokoferylochinon ( $\alpha$ -TQ) (Rys. 8A) jest związkiem obecnym w komórkach wszystkich organizmów fotosyntetycznych zdolnych do biosyntezy  $\alpha$ -Toc (Kruk i Strzałka, 1995a). U roślin natomiast  $\alpha$ -TQ występuje w chloroplastach. W obrębie tych organelli zlokalizowany jest on w błonach tylakoidów, plastoglobulach oraz otoczce chloroplastowej. Redukcja  $\alpha$ -TQ prowadzi do powstania  $\alpha$ -tokoferylochinolu ( $\alpha$ -TQH<sub>2</sub>) (Rys. 8B), który zwykle towarzyszy utlenionej formie.



Rys. 8. Wzór strukturalny  $\alpha$ -tokoferylochinonu (A) i  $\alpha$ -tokoferylochinolu (B).

Uważa się, że obecny w chloroplastach  $\alpha$ -TQ powstaje jako produkt utleniania  $\alpha$ -Toc pod wpływem RFT, podobnie jak ma to miejsce w komórkach zwierzęcych (Niki, 2007). Możliwość

formowania się  $\alpha$ -TQ na drodze tej reakcji potwierdzono zarówno w badaniach *in vitro* (Neely i in., 1988; Kaiser i in., 1990; Yamauchi i in., 1996) jak i *in vivo* (Kruk i Trebst, 2008, Kruk i in., 2008).

Występowanie  $\alpha$ -TQ stwierdzono również w komórkach wielu gatunków bakterii i drożdży nie posiadających zdolności do syntezy  $\alpha$ -Toc. Wyniki tych badań wskazują zatem na istnienie u tych mikroorganizmów alternatywnego szlaku biosyntezy tego związku, niezależnego od syntezy  $\alpha$ -Toc (Hughes i Tove, 1982). Jednak wyniki tych badań nie zostały dotychczas potwierdzone. W przypadku roślin kwestia istnienia tego typu drogi biosyntezy  $\alpha$ -TQ również pozostaje otwarta.

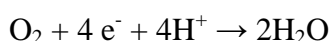
Przeciętna zawartość  $\alpha$ -TQ w zielonych tkankach roślin wynosi 1-2 moli/100 moli chlorofilu (Kruk i Strzałka, 1995a). Jego obecność została wykryta także w tkankach nie fotosyntetyzujących (w rozwijających się chromoplastach, starzejących się liściach) (Kruk i in., 2008). Natomiast  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub> znajdowano w młodych liściach fasoli (Kruk i in., 2008).

$\alpha$ -TQ w zredukowanej formie wykazuje właściwości antyoksydacyjne. Zapobiega peroksydacji lipidów i zmiata wolne rodniki (Mukai i in., 1993b; Kruk i in., 1994, 1997a, 2003) oraz regeneruje  $\alpha$ -Toc (Mukai i in., 1992, 1993a,b; Shi i in., 1999, Itoh i in., 2008).

Natomiast w formie utlenionej  $\alpha$ -TQ u roślin zaangażowany jest w ochronę aparatu fotosyntetycznego (Kruk i in., 1997a,b, 2000; Munné-Bosch i in., 2005). Wyniki badań przeprowadzonych na komórkach zwierzęcych sugerują oddziaływanie  $\alpha$ -TQ z niektórymi oksydoreduktazami oraz jego udział w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów jako potencjalnego regulatora (Siegel i in., 1997; Gille i in., 2004). Sugerowano także udział  $\alpha$ -TQ jako kofaktora w reakcji prowadzącej do wytworzenia nienasyconych wiązań w cząsteczkach kwasów tłuszczowych u człowieka (Infante, 1999).

### 1.2. Reaktywne formy tlenu

Tlen molekularny (O<sub>2</sub>, <sup>3</sup>O<sub>2</sub>) z jednej strony jest niezbędny organizmom aerobowym do zdobywania energii, z drugiej strony jednak może wykazywać działanie toksyczne. W komórkach tych organizmów pełni on rolę końcowego akceptora elektronów w procesach utleniania biologicznego, sam ulegając redukcji. Do pełnej redukcji dwuatomowej cząsteczki tlenu potrzebne są 4 elektrony (e<sup>-</sup>) i 4 protony, w wyniku czego powstają dwie cząsteczki wody (Bergamini i in., 2004):



## 1. Wstęp

Reaktywne formy tlenu (RFT) powstają jako uboczne produkty metabolizmu tlenowego, na skutek niepełnej redukcji tlenu, bądź w efekcie jego wzbudzenia.

Do RFT zaliczane są cząsteczki o charakterze rodnikowym posiadające niesparowany elektron zlokalizowany na atomie tlenu, jak rodnik hydroksylowy ( $\cdot\text{OH}$ ), a także cząsteczki o charakterze nierodnikowym takie jak  $\text{H}_2\text{O}_2$ , czy powstający w wyniku wzbudzenia  $\text{O}_2$ , tlen singletowy ( $^1\text{O}_2$ ) (Tabela 1) (Kohen i Nyska, 2002; Halliwell, 2006).

**Tabela 1.** Rodnikowe i nierodnikowe endogenne reaktywne formy tlenu.

nazwa	symbol
<b>RODNIKOWE POCHODNE TLENU</b>	
rodnik hydroksylowy (ang. <i>hydroxyl radical</i> )	$\cdot\text{OH}$
anionrodnik podantlenkowy (ang. <i>superoxide radical anion</i> )	$\text{O}_2^{\cdot-}$
rodnik wodoronadtlenkowy (ang. <i>hydroperoxyl radical</i> )	$\text{HO}_2^{\cdot-}$
tlen singletowy (ang. <i>singlet oxygen</i> )	$^1\Sigma_g^+\text{O}_2$
rodnik nadtlenkowy (ang. <i>peroxyl radical</i> )	$\text{ROO}^{\cdot}$
rodnik alkoksylowy (ang. <i>alkoxyl radical</i> )	$\text{RO}^{\cdot}$
<b>NIERODNIKOWE POCHODNE TLENU</b>	
nadtlenek wodoru (ang. <i>hydrogen peroxide</i> )	$\text{H}_2\text{O}_2$
tlen singletowy (ang. <i>singlet oxygen</i> )	$^1\Delta_g\text{O}_2$

W przeciwieństwie do tlenu w stanie podstawowym, RFT charakteryzuje wysoka reaktywność. Właściwość ta wynika z konfiguracji elektronowej RFT. Przyjrzyjmy się zatem bliżej rozkładowi elektronów na orbitalach  $\text{O}_2$  oraz pochodzących od niego RFT (Rys. 8).

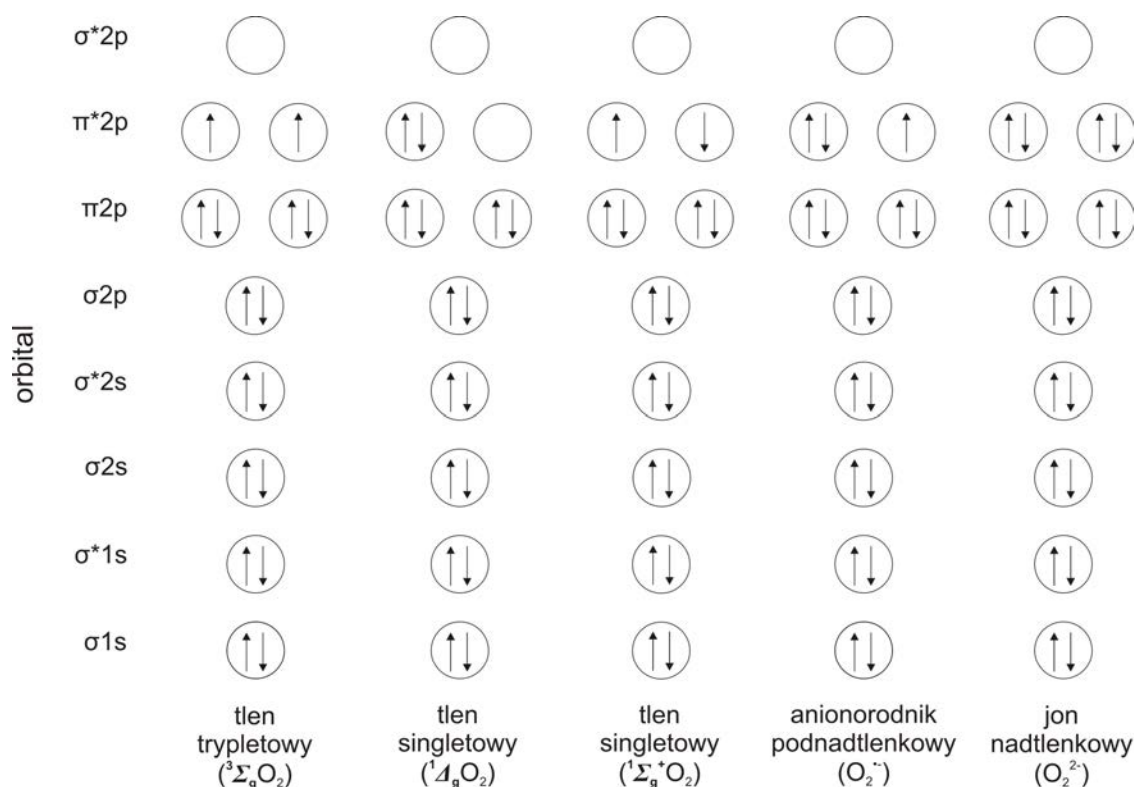
Tlen w stanie podstawowym jest birodnikiem, gdyż posiada dwa niesparowane elektrony, na antywiązących orbitalach  $p$  ( $\pi^*2p$ ). Spiny tych elektronów są równoległe, a więc całkowity spin  $S$  cząsteczki tlenu wynosi 1 ( $1/2 + 1/2 = 1$ ), zaś liczba poziomów w zewnętrznym polu magnetycznym  $2S + 1 = 3$ . Zatem tlen w stanie podstawowym jest trypletem ( $^3\text{O}_2$ ), natomiast większość związków organicznych występujących w komórkach, z którymi tlen mógłby reagować, to cząsteczki w stanie singletowym. Stąd tlen w stanie podstawowym jest mało reaktywny.

Jego reaktywność znacząco wzrasta po wzbudzeniu do stanu singletowego. Wyższa reaktywność tlenu w stanie singletowym uwarunkowana jest zniesieniem zakazu spinowego w

## 1. Wstęp

reakcjach z innymi cząsteczkami w stanie singletowym oraz nadwyżką energii otrzymanej przez niego w procesie wzbudzenia elektronowego (Apel i Hirt, 2004; Edreva, 2005; Halliwell, 2006; Bartosz, 2008).

Jak wynika z Rys. 9, przegrupowanie elektronów może zachodzić na dwa sposoby, prowadząc do powstania dwóch form tlenu singletowego:  ${}^1\Delta_g\text{O}_2$  i  ${}^1\Sigma_g^+\text{O}_2$ . Stan singletowy  ${}^1\Sigma_g^+$  charakteryzuje się bardzo krótkim czasem życia i szybko ulega dezaktywacji do stanu singletowego  ${}^1\Delta_g$ , którego czas życia jest wystarczająco długi, by mógł on reagować z innymi związkami w stanie singletowym. Dlatego też reakcje z udziałem tlenu singletowego w systemach biologicznych będą przebiegały głównie z udziałem stanu  ${}^1\Delta_g$  i właśnie do niego odnosi się nazwa „tlen singletowy”. Należy podkreślić, że w odróżnieniu od krótkożyjącego stanu singletowego  ${}^1\Sigma_g^+$ , stan  ${}^1\Delta_g$  nie jest rodnikiem, gdyż nie posiada niesparowanych elektronów (Rys. 9) (Cadenas, 1989; Knox i Dodge, 1985; Halliwell, 2006).



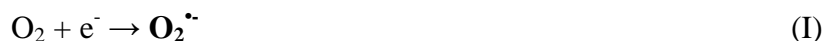
**Rys. 9.** Rozkład elektronów dla orbitali molekularnych tlenu w stanie podstawowym (określany symbolem  ${}^3\Sigma_g\text{O}_2$ ) i reaktywnych form tlenu (tlenu singletowego  ${}^1\Delta_g\text{O}_2$  i  ${}^1\Sigma_g^+\text{O}_2$ , anionorodnika nadadtlenkowego, nadadtlenku wodoru – w formie anionu  $\text{O}_2^{2-}$ ). Strzałki symbolizują elektrony, natomiast ich zwroty spiny elektronów (Halliwell, 2006; Bartosz, 2008).

Jednoelektrodowa redukcja tlenu trypletowego prowadzi do powstania innej RFT, a mianowicie anionorodnika nadadtlenkowego ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (równanie I), wykazującego charakter rodnikowy ze względu na obecność niesparowanego elektronu na orbitalu  $\pi^*2p$  oraz będącego

## 1. Wstęp

---

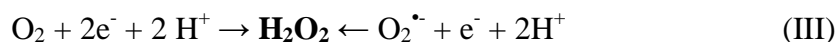
jednocześnie anionem z powodu ujemnego ładunku wypadkowego uzyskanego przez przyjęcie elektronu (Rys. 9).



Przyłączenie do  $\text{O}_2^{\bullet -}$  protonu ( $\text{H}^+$ ), w roztworze wodnym, prowadzi do powstania rodnika wodoronadtlenkowego ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ) (równanie II):



Natomiast w wyniku przyłączenia kolejnego elektronu do  $\text{O}_2^{\bullet -}$  lub dwuelektronowej redukcji tlenu ( $^3\text{O}_2$ ) powstaje jon nadtlenny ( $\text{O}_2^{2-}$ ) (Rys. 9), którego protonacja prowadzi do nadtlenu wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (równanie III):



Produktem przyłączenia trzech elektronów do cząsteczki tlenu ( $^3\text{O}_2$ ) jest z kolei rodnik hydroksylowy ( $\bullet\text{OH}$ ) (Halliwell, 2006; Bartosz, 2008).

Rodniki nadtlenny ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) i alkoksylowy ( $\text{RO}^{\bullet}$ ) powstają w wyniku peroksydacji lipidów zachodzącej w błonach komórkowych pod wpływem innych RFT (np.  $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{O}_3$ ), i uczestniczą w propagacji łańcuchowej reakcji peroksydacji, bądź odgrywają rolę inicjatorów tej reakcji atakując kolejne cząsteczki lipidów (Bartosz, 2008).

Do reaktywnych form tlenu (egzogennych) zaliczamy jest również ozon ( $\text{O}_3$ ), występujący w górnych warstwach atmosfery. Ma on bardzo duże znaczenie dla organizmów żyjących na Ziemi, gdyż pochłaniając promieniowanie nadfioletowe (w zakresie 200-280 nm w 100% oraz 280-320 nm w 90%), chroni je przed jego mutagennym i kancerogennym działaniem. Natomiast ozon obecny w najniższych warstwach atmosfery, jako wtórne zanieczyszczenie powietrza, podobnie jak pozostałe RFT odznacza się wyższą reaktywnością niż tlen trypletowy i wchodząc w reakcje ze składnikami komórki prowadzi do jej uszkodzenia (Bartosz, 2008).

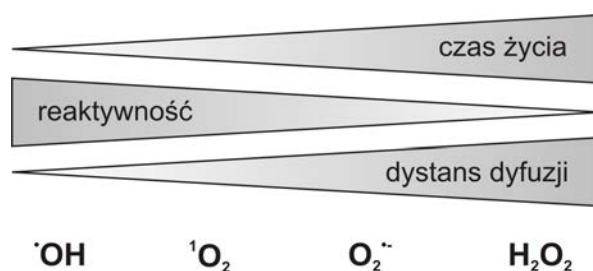
Większość RFT charakteryzuje się krótkim czasem życia, uzależnionym od charakteru środowiska (pH, polarność). Spośród wszystkich RFT generowanych w komórce,  $\bullet\text{OH}$  charakteryzuje się najkrótszym czasem życia (poniżej 1 ns) i zarazem najwyższą reaktywnością (Kohen i Nyska, 2002). Czas życia RFT decyduje o możliwościach jego przemieszczania się w komórce, a tym samym miejscu ich reakcji z atakowanymi związkami. W przypadku  $\bullet\text{OH}$  jego niezwykle krótki czas życia ogranicza możliwość zajścia reakcji do miejsca jego powstawania. Rodnik ten może reagować praktycznie z każdą napotkaną cząsteczką, z szybkością regulowaną w zasadzie przez dyfuzję ( $k > 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Dat i in., 2000). Reaktywnością zbliżoną do  $\bullet\text{OH}$  charakteryzuje się  $^1\text{O}_2$ , który podobnie jak  $\bullet\text{OH}$  może wchodzić w reakcje z większością składników komórkowych (lipidy, reszty aminokwasów, zasady azotowe kwasów nukleinowych). Ze względu na krótki czas życia, reaktywność  $^1\text{O}_2$ , podobnie jak  $\bullet\text{OH}$ , ogranicza



## 1. Wstęp

się głównie do miejsca jego generacji (ok. 4  $\mu\text{s}$ ) (Redmond i Kochevar, 2006; Triantaphylides i in., 2008; Triantaphylides i Havaux, 2009). Natomiast  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (w warunkach niskiego pH, w formie  $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) jest na tyle trwały w fizjologicznym zakresie pH, aby móc reagować z cząsteczkami zlokalizowanymi poza miejscem jego powstawania (Kohen i Nyska, 2002). Najchętniej reaguje on ze związkami o charakterze redukującym, takimi jak askorbinian i NADH, łatwo reaguje z jonami metali przejściowych (żelaza i miedzi), a także grupami tiolowymi (-SH) reszt aminokwasowych (Bartosz, 2008, Kohen i Nyska, 2002). Relatywnie długim czasem życia (1 ms) i związaną z tym możliwością dyfuzji na znaczne odległości od miejsca produkcji charakteryzuje się  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Uszkodzenia komórki powodowane przez tę RFT można podzielić na dwie kategorie: bezpośrednie działanie oksydacyjne na składniki komórkowe (utlenianie grup -SH i jonów metali przejściowych) oraz działanie pośrednie jako substratu do wytwarzania bardziej toksycznych RFT ( $\cdot\text{OH}$ ) (Kohen i Nyska, 2002).

Zależności pomiędzy czasem życia, reaktywnością i zdolnością do dyfuzji dla poszczególnych RFT zostały przedstawione na Rys. 10.



**Rys. 10.** Czas życia, reaktywność w stosunku do składników komórki oraz dystans dyfuzji wybranych reaktywnych form tlenu (Redmond i Kochevar, 2006).

### 1.3. Miejsca generacji reaktywnych form tlenu w komórce roślinnej

RFT powstają w komórkach wszystkich aerobów, jako produkty uboczne normalnego metabolizmu komórki. W komórkach roślinnych takimi procesami są m.in. fotosynteza i oddychanie. W normalnych warunkach, produkcja RFT w komórkach utrzymywana jest na niskim poziomie, wynoszącym  $240 \mu\text{M s}^{-1}$  dla  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $0,5 \mu\text{M}$  dla  $\text{H}_2\text{O}_2$  w chloroplastach (Mittler, 2002). Wzmoczona produkcja RFT następuje w warunkach działania różnorodnych czynników stresowych, których źródłem mogą być susza, zasolenie, metale ciężkie, zanieczyszczenia powietrza ( $\text{O}_3$ ,  $\text{SO}_2$ ), zbyt intensywne lub za słabe oświetlenie, czy patogeny. W tych warunkach, określanym mianem stresu oksydacyjnego, dochodzi m.in. do uruchomienia szlaków prowadzących do produkcji dodatkowych ilości RFT (np. działalność oksydazy glikolowej

## 1. Wstęp

podczas fotooddychania), co w konsekwencji wywołuje wzrost ich poziomu w komórce ( $240\text{--}720 \mu\text{M s}^{-1}$  dla  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $5\text{--}15 \mu\text{M}$  dla  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Mittler, 2002). Jeśli równowaga pomiędzy ilością wytwarzanych i neutralizowanych w komórce RFT zostanie zbyt mocno zachwiana, kumulacja oksydacyjnych uszkodzeń składników komórki może prowadzić do jej śmierci na drodze nekrozy (śmierć niekontrolowana genetycznie) lub tzw. reakcji nadwrażliwości (ang. hypersensitive reaction), czyli śmierci programowanej (Bartosz, 1997; Overmyer i in., 2003).

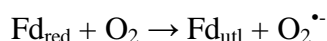
Do powstawania RFT w komórce roślinnej, poza mitochondriami i chloroplastami, dochodzi w peroksosomach, błonie komórkowej, ścianie komórkowej i na terenie apoplastu (Tabela 2) (Corpas i in., 2001).

W chloroplastach głównym źródłem RFT jest proces fotosyntezy, a dokładniej fotosystemy PSI i PSII. Główną formą RFT powstającą w obrębie tych fotosystemów jest  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (PSI, PSII) i  $^1\text{O}_2$  (PSII) (Rys. 11A). W normalnych warunkach PSI katalizuje uruchamiany przez światło transport elektronów ze zredukowanej plastocyjaniny na ferredoksynę. Z kolei ferredoksyna przenosi elektrony na  $\text{NADP}^+$ , który w formie zredukowanej (NADPH) włączany jest do cyklu Calvina, gdzie uczestniczy w redukcji  $\text{CO}_2$ .

**Tabela 2.** Miejsce i droga powstawania RFT w komórce roślinnej.

miejsce produkcji w komórce RFT	chloroplast	mitochondrium	peroksosom	błona komórkowa	ściana komórkowa	apoplast
$\text{O}_2^{\cdot-}$	fotosyntetyczny łańcuch transportu elektronów (PSI i PSII)	łańcuch oddechowy (kompleks I i III, pula UQ)	oksydaza ksantynowa	oksydaza NADPH	peroksydazy	
$\text{H}_2\text{O}_2$	dysmutacja $\text{O}_2^{\cdot-}$	dysmutacja $\text{O}_2^{\cdot-}$	fotooddychanie (oksydaza glikolanowa), $\beta$ -oksydacja kwasów tł.,		peroksydazy	oksydaza szczawianowa, oksydaza aminowa
$\cdot\text{OH}$	z $\text{H}_2\text{O}_2$ w reakcji Fentona	z $\text{H}_2\text{O}_2$ w reakcji Fentona	z $\text{H}_2\text{O}_2$ w reakcji Fentona			
$^1\text{O}_2$	wzbudzone cz. chlorofilu w obrębie PSII					

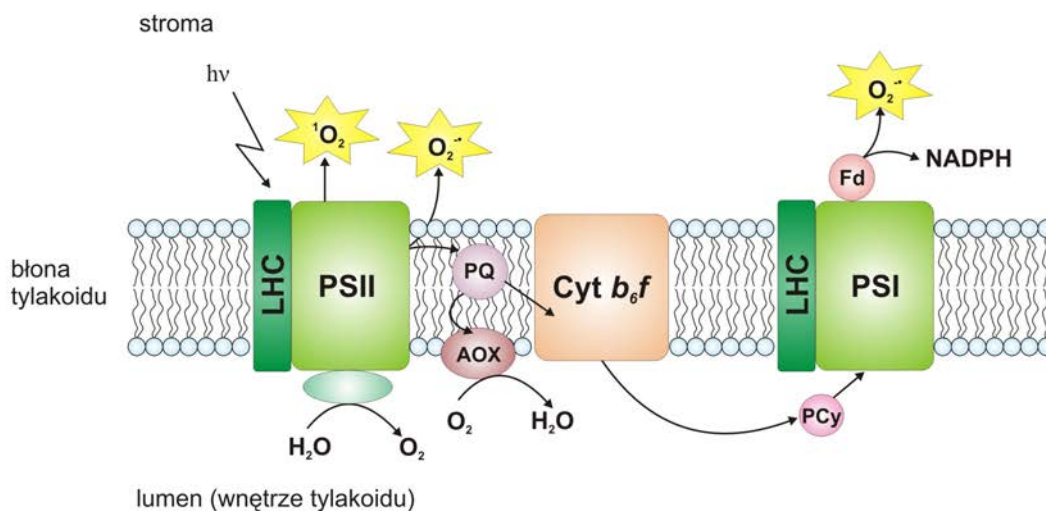
W sytuacji, gdy dochodzi do przeładowania łańcucha transportu elektronów (znaczna redukcja puli ferredoksyny oraz nadmiar NADPH w stosunku do ATP), elektrony poprzez zredukowaną Fd mogą być przenoszone bezpośrednio na tlen cząsteczkowy, redukując go w tzw. reakcji Mehlera do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ :



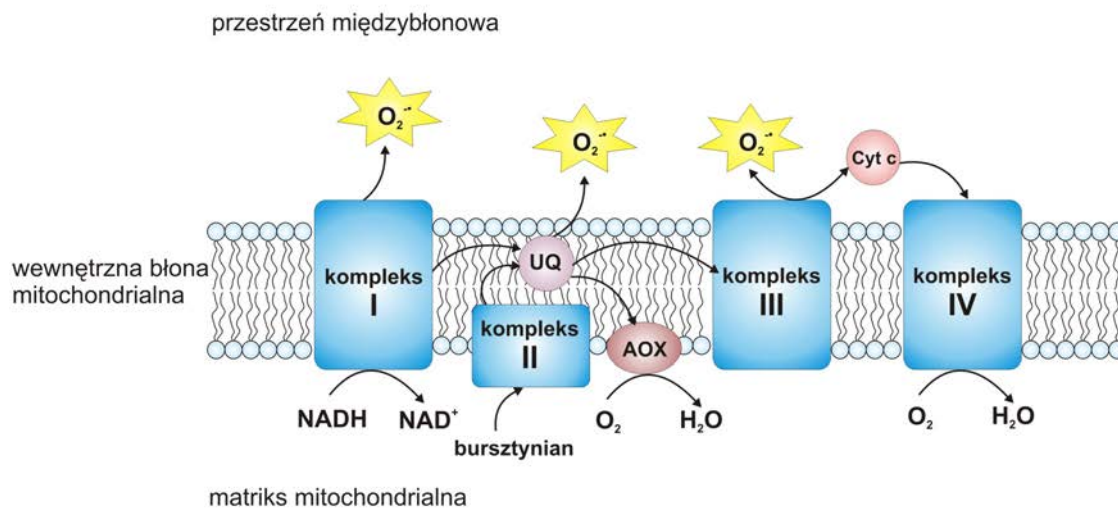
## 1. Wstęp

Wyciek elektronów z łańcucha transportu elektronów w obrębie PSI i ich przeniesienie na  $O_2$ , może zachodzić także przy udziale centrów żelazo-siarkowych (2Fe-2S i 4Fe-4S) (Dat i in., 2000; Edreva, 2005). Do powstawania  $O_2^{\cdot-}$  na skutek jednoelektronowej redukcji  $O_2$  dochodzi także w obrębie PSII, po jego akceptorowej stronie. Rolę donorów w tym procesie spełniają feofityna oraz plastochinon  $Q_A$  (Edreva, 2005; Preposil, 2009).

(A)



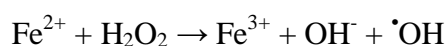
(B)



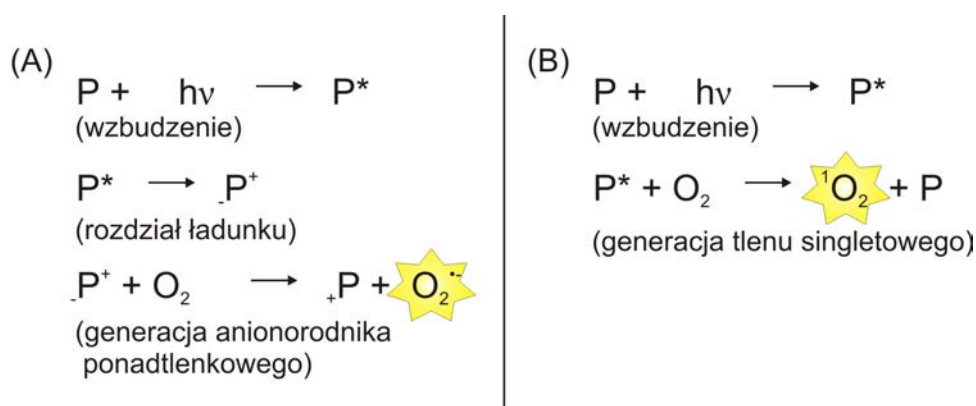
**Rys. 11.** Miejsca generacji reaktywnych form tlenu w fotosyntetycznym (A) i oddechowym (B) łańcuchu transportu elektronów u roślin. LHC – kompleksy zbierające energię, PSI, PSII – fotosystemy, OEC – kompleks utleniający wodę, PQ – plastochinon, PCy – plastocyjanina, Fd – ferredoksyna, Cyt  $b_6f$  – cytochrom  $b_6f$ , AOX – oksydaza alternatywna, Cyt c – cytochrom c, kompleks I – oksydoreduktaza NADH-Q, kompleks II – oksydoreduktaza bursztynian-Q, kompleks III – oksydoreduktaza cytochromowa, kompleks IV – oksydaza cytochromowa,  $^1O_2$  – tlen singletowy,  $O_2^{\cdot-}$  – anionorodnik ponadtlenkowy.

## 1. Wstęp

Anionorodnik ponadtlenkowy powstały w opisanych powyżej procesach może być przekształcony do bardziej toksycznych RFT. W wyniku dysmutacji, na drodze spontanicznej, lub przy udziale dysmutazy ponadtlenkowej (SOD),  $O_2^{\cdot-}$  ulega przekształceniu do  $H_2O_2$ . Związek ten jest dość stabilny i może swobodnie dyfundować na znaczne odległości w poprzek błony, rozszerzając tym samym zasięg toksycznego działania na składniki komórki. Nadtlenek wodoru może również ulegać dalszym przekształceniom. W wyniku reakcji Fentona katalizowanej przez jony żelaza(II) (będących integralną częścią centrów Fe-S) może tworzyć wysoce reaktywny  $\cdot OH$  (Edreva, 2005; Ledford i Niyogi, 2005; Asada, 2006; Song i in., 2006):



Dodatkowo w obrębie PSII, RFT mogą powstawać także na drodze reakcji zależnych od światła za pośrednictwem wzbudzonych cząsteczek chlorofilu. Chlorofil, główny barwnik fotosyntetyczny w obrębie kompleksów zbierających energię świetlną (LHC), charakteryzuje się wysoką efektywnością w pochłanianiu promieniowania widzialnego i czasem życia wzbudzonych cząsteczek wystarczającym do przetworzenia energii wzbudzenia w potencjał elektrochemiczny poprzez rozdział ładunku (Krieger-Liszkay i in., 2008). Jeżeli ta zgromadzona energia nie jest efektywnie zużywana, wówczas może dochodzić do aktywacji tlenu poprzez wzbudzone cząsteczki barwnika. Reakcje te mogą zachodzić dwutorowo, na zasadzie rozdziału ładunku bądź poprzez przeniesienie energii ze wzbudzonej cząsteczki Chl (chlorofilu w stanie trypletowym) na tlen molekularny. W pierwszym przypadku generowany jest  $O_2^{\cdot-}$  (Rys. 12A), w drugim powstaje  $^1O_2$  (Rys. 12B) (Edreva, 2005; Triataphylides i Havaux, 2009).



**Rys. 12.** Formowanie się RFT za pośrednictwem wzbudzonych cząsteczek chlorofilu na drodze rozdziału ładunku (A) oraz transferu energii wzbudzenia na tlen molekularny  $O_2$  (B), P – pigment (Edreva, 2005 - zmodyfikowane).

Do formowania  $^1O_2$  w PSII dochodzi, gdy z powodu nadmiernego dopływu energii świetlnej, szybki przepływ elektronów z feofityny do plastochinonu  $Q_A$ , powoduje jego nadmierną redukcję, konsekwencją czego jest zablokowanie dalszego transportu elektronów. W

tych warunkach dochodzi do generacji chlorofilu trypletowego ( $^3\text{Chl}$ ), który reagując z tlenem molekularnym ( $^3\text{O}_2$ ) prowadzi do powstania  $^1\text{O}_2$  (Apel i Hirt, 2004, Krieger-Liszkay, 2004; Vass i in., 2007). Do powstawania  $^1\text{O}_2$  w centrum reakcji (PSII) może dochodzić także w wyniku rekombinacji ładunków, która zachodzi głównie w warunkach ekspozycji na silne światło lub suszę (Krieger-Liszkay i in., 2008).

Badania przeprowadzone na glonie *Bryopsis corticulans* wskazują, że w warunkach stresu świetlnego, formowanie  $^1\text{O}_2$  może zachodzić również przy udziale cząsteczki chlorofilu *a*, wchodzącej w skład cyt *b<sub>6</sub>f* (Sang i in., 2010).

Mitochondrialny łańcuch transportu elektronów, podobnie jak fotosyntetyczny, także jest źródłem powstawania RFT (Möller, 2001; Rhoads i in., 2006; Navrot i in., 2007). W procesie oddychania komórkowego tlen ulega redukcji do wody, zaś energia uwolniona podczas tych reakcji zużywana jest do syntezy ATP. Wyciek elektronów na poziomie kompleksu I i III prowadzi do jednoelektronowej redukcji  $\text{O}_2$  i wytworzenia  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Rhoads i in., 2006; Navrot i in., 2007). Silna redukcja puli ubichinonu (UQ-10) przez kompleks I również prowadzi do powstawania  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Rys. 11B) (Navrot i in., 2007).

Podobnie jak w przypadku  $\text{O}_2^{\cdot-}$  generowanego na terenie chloroplastów, większość  $\text{O}_2^{\cdot-}$  powstającego w obrębie mitochondrium ulega przekształceniu do  $\text{H}_2\text{O}_2$  przez manganową dysmutazę ponadtlenkową (MnSOD).  $\text{H}_2\text{O}_2$  natomiast, reagując z jonami żelaza lub miedzi (reakcja Fentona), może wytwarzać  $^{\cdot}\text{OH}$  (Navrot i in., 2007).

Formowanie RFT zachodzi także na terenie peroksysomów. Procesami metabolicznymi przyczyniającymi się do powstawania  $\text{H}_2\text{O}_2$  na terenie peroksysomów są  $\beta$ -oksydacja kwasów tłuszczowych, reakcje enzymatyczne z udziałem oksydazy flawinowej (flavin oxidase), reakcja dysproporcjonowania  $\text{O}_2^{\cdot-}$  oraz zachodząca podczas fotooddychania (u roślin  $\text{C}_3$ ), reakcja katalizowana przez oksydazę glikolanową (Schrader i Fahimi, 2006; Corpas i in., 2001). Skompleksowane jony metali przejściowych (żelazo, miedź) obecne w peroksysomach, mogą na drodze reakcji Fentona, przekształcać  $\text{H}_2\text{O}_2$  w  $^{\cdot}\text{OH}$  (Schrader i Fahimi, 2006). Na terenie peroksysomów dochodzi także do produkcji  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , w reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową (XOD, ang. xanthine oxidase) (Corpas i in., 2001; Nyathi i Baker, 2006).

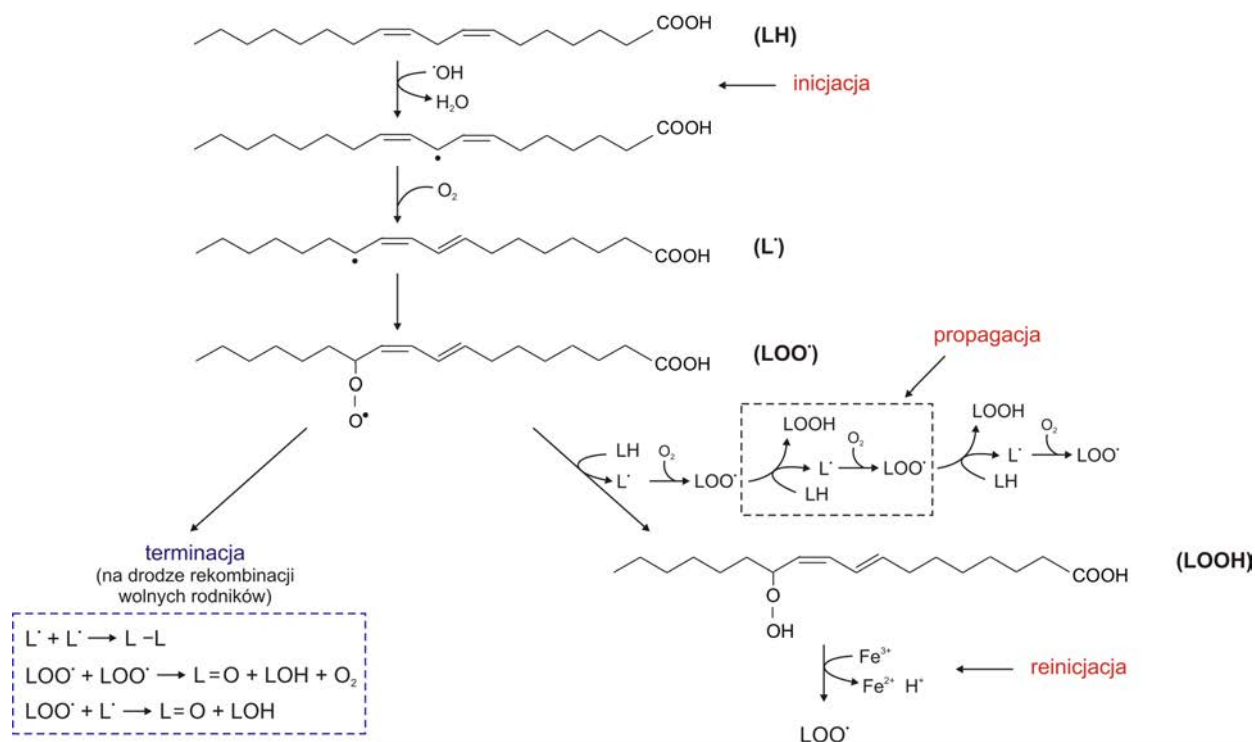
Występujące w ścianie komórkowej peroksydazy zależne od pH, biorą udział w powstawaniu RFT, a mianowicie  $\text{H}_2\text{O}_2$  oraz  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Do powstawania  $\text{O}_2^{\cdot-}$  dochodzi także w błonie komórkowej przy udziale oksydazy zależnej od NADPH (Dat i in., 2000; Mittler, 2002). Natomiast aktywność oksydazy szczawianowej i aminowej na terenie apoplastu prowadzi do generacji  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Mittler, 2002).

### 1.4. Uszkodzenia komórki powodowane przez reaktywne formy tlenu

Ze względu na wysoką reaktywność RFT mogą reagować niemal ze wszystkimi składnikami komórki, prowadząc do ich uszkodzenia. Powodują one przede wszystkim: peroksydację lipidów błon komórkowych, inaktywację fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów, zaburzenia procesu oddychania komórkowego, uszkodzenia kwasów nukleinowych i białek.

Najbardziej podatnymi na peroksydację składnikami komórki są wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA), wchodzące w skład cząsteczek lipidów będących głównym komponentem błon komórkowych. Reakcja peroksydacji jest procesem wolnorodnikowym i składa się z trzech etapów: inicjacji, propagacji oraz terminacji. Poszczególne etapy wolnorodnikowej peroksydacji PUFA ilustruje Rys. 13. Inicjacja rozpoczyna się oderwaniem atomu wodoru ( $H^\bullet$ ) od cząsteczki lipidu (a dokładnie reszty kwasu tłuszczowego) przy udziale RFT (Kohen i Nyska, 2002; Blokhina i in., 2003; Bergamini i in., 2004).

Inicjatorami peroksydacji mogą być  $\cdot OH$  i  $HO_2^\bullet$ , jak również rodniki: nadtlenkowy ( $LOO^\bullet$ ), alkoksyłowy ( $LO^\bullet$ ) i alkilowy ( $L^\bullet$ ), będące jednocześnie produktami tego procesu (Dix i Aikens, 1993; Blokhina i in., 2003).



**Rys. 13.** Wolnorodnikowa peroksydacja wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (Bartosz, 2008 zmodyfikowane).

Atom wodoru odrywany jest zwykle od atomu węgla sąsiadującego z atomem węgla połączonym wiązaniem podwójnym (tzw. izolowany układ wiązań podwójnych). Wynikiem tego procesu jest powstanie rodnika alkilowego ( $L^\bullet$ ), posiadającego niesparowany elektron na atomie węgla, od którego odłączył się atom wodoru. Następnie dochodzi do przegrupowania elektronów w cząsteczce  $L^\bullet$  dla uzyskania większej stabilności rodnika. Skutkiem tych przemian jest wytworzenie  $L^\bullet$  o sprzężonym układzie wiązań podwójnych.

W kolejnym etapie reakcji peroksydacji (fazie propagacji),  $L^\bullet$  reaguje z tlenem molekularnym tworząc rodnik nadtlenkowy ( $LOO^\bullet$ ). Ten z kolei może atakować kolejną cząsteczkę lipidu, prowadząc do powstania nadtlenku kwasu tłuszczowego ( $LOOH$ ) oraz  $L^\bullet$ . Ten etap reakcji peroksydacji może powtarzać się wielokrotnie, powodując uszkodzanie kolejnych cząsteczek lipidów.

Dopiero reakcja dwóch wolnych rodników, czyli ich rekombinacja, prowadzi do utworzenia nierodnikowego produktu i tym samym terminację procesu peroksydacji. Produktami terminacji peroksydacji mogą być okso- i hydroksykwasy tłuszczowe oraz dimery kwasów tłuszczowych. Związki te mogą ulegać dalszym przemianom (rozpadowi na kilku-, kilkunastowęglowe fragmenty), prowadzącym do powstania aldehydów (dialdehyd malonowy, 2-alkenale), hydroksyaldehydów (4-hydroksyalkenale, 5-hydroksyoktanal) i węglowodorów (etan, pentan) (Błochina i in., 2003; Bartosz, 2008).

Procesowi peroksydacji może towarzyszyć zjawisko zwane reinicjacją, które polega na generowaniu wolnych rodników w wyniku rozpadu  $LOOH$  pod wpływem jonów metali przejściowych (najczęściej żelaza i miedzi) (Błochina i in., 2003; Bartosz, 2008).

Również  $^1O_2$  i  $O_3$ , mogą być inicjatorami peroksydacji lipidów, przy czym mechanizm tego procesu przebiega na drodze nierodnikowej (Triantaphylides i in., 2008; Niki, 2009). Reakcja peroksydacji inicjowana przez  $^1O_2$  polega na jego przyłączeniu do wiązania podwójnego w cząsteczce kwasu tłuszczowego, czemu towarzyszy przegrupowanie wiązań podwójnych analogiczne jak w mechanizmie peroksydacji wolnorodnikowej i wytworzeniu  $LOOH$ , które mogą ulegać rozpadowi do związków karbonylowych (Niki, 2009). W przypadku peroksydacji kwasów tłuszczowych przy udziale  $O_3$ , pierwotnymi produktami tej reakcji są ozonki, które są związkami nietrwałymi i ulegają rozpadowi do  $LO^\bullet$  i  $LOO^\bullet$  oraz aldehydów (Bartosz, 2008).

Produkty peroksydacji lipidów zmieniają właściwości fizyczne błon komórkowych. Powodują zmniejszenie ich płynności, zmiany w przepuszczalności dla jonów i cząsteczek (np.  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ), uszkodzenia białek oraz inaktywację receptorów, enzymów i kanałów jonowych, co w konsekwencji może prowadzić do utraty integralności błon komórkowych (Halliwell, 2006).

RFT mogą także uszkadzać białka, powodując ich peroksydację, modyfikacje reszt aminokwasowych, zmiany w ich strukturze IV-rzędowej, degradację i fragmentację cząsteczek. Konsekwencją tych uszkodzeń jest zwykle utrata aktywności biologicznej białka. RFT biorącymi udział w tych procesach są głównie  $\cdot\text{OH}$ ,  $^1\text{O}_2$  i  $\text{RO}\cdot$ . Także  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2\cdot^-$  mogą prowadzić do modyfikacji białek poprzez utlenianie grup  $-\text{SH}$ . Utlenianie białek za pośrednictwem RFT prowadzi zwykle do powstawania aldehydów i ketozwiązków (Kohen i Nyska, 2002; Bergamini i in., 2004; Davies, 2003, 2004; Redmond i Kochevar; 2006).

Kwasy nukleinowe, jako nośniki informacji genetycznej, w porównaniu do lipidów i białek są bardziej stabilnymi i dobrze chronionymi cząsteczkami. Jednak i ten składnik komórkowy może być atakowany przez RFT. Sprawcami tych uszkodzeń są  $\cdot\text{OH}$  oraz  $^1\text{O}_2$ . Najbardziej podatne na reakcje z  $^1\text{O}_2$  są reszty guaniny, natomiast w przypadku  $\cdot\text{OH}$  najchętniej atakowane są reszty tymidyny. Rodnik hydroksylowy może reagować także z resztami cukrowymi w cząsteczkach kwasów nukleinowych (deoksyrybozą w DNA i rybozą w RNA), a także prowadzić do pęknięcia nici kwasów nukleinowych na skutek rozerwania wiązań fosfodiesterowych łączących poszczególne nukleotydy (Kohen i Nyska, 2002; Bergamini i in., 2004; Cadet i in., 2006; Bartosz, 2008).

Szkodliwe działanie RFT na składniki komórki może prowadzić do zaburzeń bądź hamowania procesów zachodzących w komórce. Tak dzieje się chociażby w przypadku fotosyntezy. W sytuacji, gdy  $^1\text{O}_2$  powstający w warunkach stresowych (silne światło) w obrębie PSII nie jest efektywnie neutralizowany może powodować fotooksydację PSII (utlenianie białka D1 i cząsteczek barwników fotosyntetycznych), prowadząc w ten sposób do inaktywacji całego fotoukładu (Krieger-Liszkay, 2004).

### 1.5. Mechanizmy obronne komórki przed reaktywnymi formami tlenu

Pomimo toksycznego wpływu RFT na składniki i procesy komórkowe, komórki nie są bezbronne i potrafią sobie z nimi radzić. Wykształciły one trzy mechanizmy chroniące je przed szkodliwym działaniem RFT. Pierwsza linia obrony obejmuje procesy mające na celu uniknięcie reakcji RFT ze składnikami komórkowymi. W przypadku, gdy już dojdzie do powstania RFT, strategia obrony komórki przed ich szkodliwym działaniem skupia się na usuwaniu RFT i hamowaniu reakcji łańcuchowych przez nie zainicjowanych. Wszystkie te procesy stanowią tzw. drugą linię obrony. Trzecia linia obrony komórki przed RFT to procesy o charakterze



naprawczym, prowadzące do usunięcia uszkodzeń powstałych wskutek działania RFT (Bergendi i in., 1999; Möller, 2001, Bartosz, 2008).

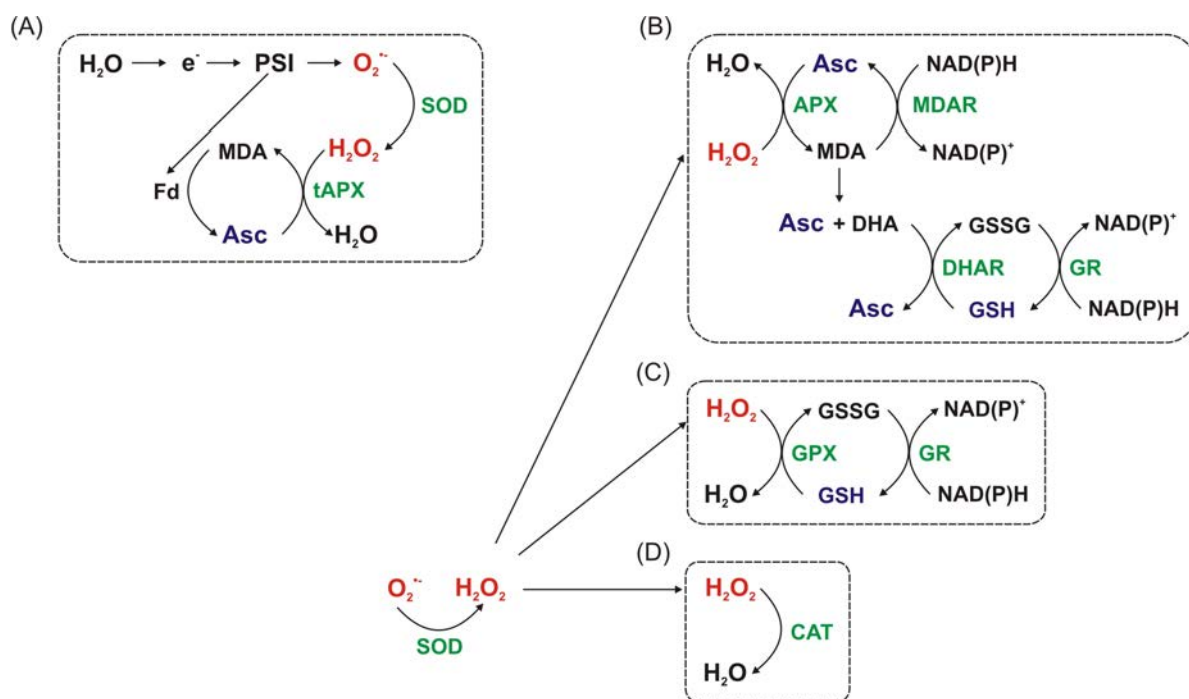
Zapobieganie formowaniu RFT w komórce wydaje się być równie ważne, jak samo zmiatanie już powstałych RFT. Wzmoczona ich produkcja często jest wynikiem narażenia organizmu na działanie różnego typu czynników stresowych (np.: susza, zbyt silne oświetlenie), dlatego też mechanizmy ograniczające wytwarzanie RFT u roślin w pewnym stopniu mogą polegać na dostosowaniu organizmu do zmiennych warunków środowiska. Adaptacje te mogą mieć charakter anatomiczny (np.: ruchy i zwijanie się liści zapobiegające nadmiernemu dostarczaniu energii świetlnej), fizjologiczny (np.: przebieg fotosyntezy u roślin C<sub>4</sub> i CAM), bądź molekularny (np.: zmiany organizacji anten zbierających energię świetlną w zależności od warunków oświetlenia) (Mittler, 2002). Zapobieganie nadmiernemu wytwarzaniu RFT może odbywać się również na drodze enzymatycznej. Rolę taką pełni m.in. chloroplastowa i mitochondrialna oksydaza alternatywna (AOX), która przenosząc elektrony bezpośrednio na tlen redukuje go do wody, zapobiegając w ten sposób generacji O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i jednocześnie obniżając poziom O<sub>2</sub> (Rys. 11A, B), będącego substratem do wytwarzania RFT. Podobną funkcję pełni także występujące w mitochondriach białko rozprzegające (UCP) (Möller, 2001; Mittler, 2002). Ważną rolę w pierwszej linii obrony przed RFT odgrywają także enzymy dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza, usuwające substraty do wytwarzania <sup>•</sup>OH. Drugi mechanizm ochrony komórki przed powstawaniem tej niezwykle reaktywnej formy tlenu polega na silnym wiązaniu jonów żelaza i innych metali przejściowych, co uniemożliwia generację <sup>•</sup>OH w reakcji Fentona (Bartosz, 1997; Mittler, 2002).

Druga linia obrony komórki roślinnej przed RFT reprezentowana jest przez szereg niskocząsteczkowych związków o różnej strukturze chemicznej i silnych właściwościach redukcyjnych, czyli antyoksydanty, wśród których znajdują się zarówno te zdolne do działania w środowisku wodnym komórki, jak i wewnątrz błon komórkowych. Głównymi antyoksydantami działającymi w środowisku wodnym są askorbinian (Asc) i glutation (GSH). Do antyoksydantów o charakterze hydrofobowym zaliczamy przede wszystkim tokoferole, tokotrienole, karotenoidy i wiele związków fenolowych (Bartosz, 1997; Mittler, 2002). Działanie przeciwutleniające wykazują także zredukowane formy PQ-9, UQ-10 i α-TQ (Hundal i in., 1995; Bentinger i in., 2007; Niki, 2007).

Antyoksydacyjna linia obrony przed RFT wspierana jest także przez układy enzymatyczne, których zadaniem jest bezpośrednie zmiatanie RFT oraz zapewnienie możliwości regeneracji antyoksydantów (Mittler 2002; De Gara i in., 2003; Mittler i in., 2004; Blokhina i Fagerstedt, 2010).

## 1. Wstęp

Głównym enzymem uczestniczącym w neutralizacji RFT ( $O_2^{\bullet -}$ ), obecnym w większości przedziałów komórkowych, jest dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) (Rys. 14). Do innych szlaków detoksyfikujących komórkę roślinną należą chloroplastowy cykl woda-woda (Rys. 14A); cykl askorbinianowo-glutationowy (Rys. 14B) działający na terenie chloroplastów, cytozolu, mitochondriów, apoplastu i peroksyosomów; oraz peroksydaza glutationowa (GPX) (Rys. 14C) i katalaza (CAT) (Rys. 14D) działające w obrębie peroksyosomów (Mirrler, 2002).



**Rys. 14.** Szlaki enzymatyczne zaangażowane w zmiatanie RFT w komórce roślinnej, (A) – cykl woda-woda, (B) – cykl askorbinianowo-glutationowy, (C) – cykl peroksydazy glutationowej, (D) – aktywność katalazy (wg Mittler, 2002). Kolorem czerwonym oznaczono RFT, niebieskim – antyoksydanty, zielonym – enzymy katalizujące reakcje neutralizacji RFT; PSI – fotosystem I, Fd – ferredoksyna, Asc – askorbinian, GSH – glutation, GSSG – disulfid glutationu, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa, CAT – katalaza, GPX – peroksydaza glutationowa, GR – reduktaza glutationowa, APX – peroksydaza askorbinianowa, tAPX – APX związana z błonami tylakoidów, MDA – monodehydroksyaskorbinian, MDAR – reduktaza monodehydroksyaskorbinianowa, DHA – dehydroksyaskorbinian, DHAR – reduktaza dehydroksyaskorbinianu.

Ważną rolę pełni także układ tioredoksyny (TRX), którego zadaniem jest m. in. ochrona białek przed stresem oksydacyjnym (redukuje mostki disiarczkowe powstające na skutek działania utleniaczy) (Bartosz, 2008; Blokhina i Fagerstedt, 2010).

Antyoksydanty mogą też uczestniczyć w usuwaniu spowodowanych przez RFT uszkodzeń, czyli tzw. trzeciej linii obrony. Przykładem może być GSH, który reagując z rodnikami makrocząsteczek (np. białek) może prowadzić do ich „naprawy”. Dzięki zdolności redukcji grup  $-SH$ , także tioredoksyna może brać udział w procesach naprawczych. Z kolei naprawą uszkodzeń DNA zajmują się wyspecjalizowane układy enzymatyczne jak ligazy, glikozydazy czy układ SOS (Bartosz, 2008).

### 1.6. Udział w przekazywaniu sygnałów w komórce - drugie oblicze reaktywnych form tlenu

Wyniki wielu badań przeprowadzonych na przestrzeni ostatnich lat wskazują, że zmiany poziomu RFT w komórce mogą być przetwarzane na sygnały, które z kolei wpływają na aktywność transkrypcyjną genów (Apel i Hirt, 2004; Laloi i in., 2004). Mogą one także pośredniczyć w przekazywaniu sygnałów w komórce. RFT pełniącymi rolę cząsteczek sygnałowych są głównie  $O_2^{\bullet-}$  i  $H_2O_2$ , które charakteryzują się dość niską reaktywnością, a ich wytwarzanie oraz degradacja odbywa się na drodze enzymatycznej. Ponadto  $H_2O_2$ , odznacza się największą trwałością oraz mobilnością spośród wszystkich RFT generowanych w komórce (Bartosz, 2009).

$H_2O_2$  produkowany przez, związane z błonami komórkowymi, cytozolowe oksydazy zależne od NADPH odgrywa rolę przekaźnika zaangażowanego w odpowiedź komórki na stres różnego pochodzenia. Bierze on udział w reakcji komórki przeciwko patogenom, regulacji zamykania aparatów szparkowych, wzrostu komórki, rozwoju roślin i śmierci komórki (Mittler, 2002; Laloi i in., 2003; Overmyer i in., 2003; Mittler i in., 2004).

Wyniki badań przeprowadzonych na ziemniaku wykazały udział  $O_2^{\bullet-}$  w rozwoju bulw oraz regulacji wzrostu poprzez jego wpływ na poziom gibereliny (Kim i in., 2007).

Badania wskazują, że także  $^1O_2$  może brać udział w przekazywaniu sygnałów w komórce (Mittler i in., 2004; Triantaphylides i Havaux, 2009). Ze względu na krótki czas życia  $^1O_2$  oraz ograniczoną możliwość dyfuzji w komórce, mechanizm przekazywania sygnałów za jego pośrednictwem najprawdopodobniej oparty jest na utlenianiu przez  $^1O_2$  różnych związków (lipidów, reszt aminokwasowych, karotenoidów, chlorofili, tokoferoli) i przekazywaniu sygnału za pośrednictwem produktów tych reakcji (Triantaphylides i Havaux, 2009).

Badania genetyczne przeprowadzone na mutancie *Arabidopsis thaliana* (mutant *flu*), wykazały, że  $^1O_2$ , podobnie jak  $H_2O_2$ , odgrywa rolę przekaźnika sygnałów w procesach związanych z programowaną śmiercią komórki, a chloroplastowe białka EXECUTER 1 i 2 pełnią rolę supresorów śmierci komórki indukowanej przez  $^1O_2$  (Lee i in., 2007). Natomiast badania przeprowadzone na komórkach glonu *Chlamydomonas reinhardtii* wykazały, że  $^1O_2$  indukuje ekspresję kodowanej przez jądro peroksydazy glutationowej (Fischer i in., 2007). Ponadto lokalizacja tej kaskady sygnałowej poza błonami tylakoidów wskazuje, że mechanizmy przekazywania sygnałów mogą mieć bardzo różnorodny charakter.

### 1.7. Cel pracy

- analiza porównawcza zawartości plastochromanolu i pozostałych tokochromanoli w dostępnych komercyjnie olejach roślinnych oraz opracowanie preparatywnej metody izolacji plastochromanolu
- wyznaczenie stałych szybkości wygaszania ( $k_Q$ ) tlenu singletowego przez badane lipidy prenylowe
- analiza produktów reakcji chemicznej lipidów prenylowych z tlenem singletowym
- pomiary generacji tlenu singletowego w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* w warunkach stresu świetlnego
- badanie udziału  $\alpha$ -tokoferolu i plastochinonu-9 w zmiataniu tlenu singletowego w warunkach stresu świetlnego w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii*
- badanie zdolności hamowania procesu peroksydacji lipidów przez lipidy prenylowe w układzie liposomowym

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Odczynniki

#### **rozpuszczalniki organiczne:**

aceton, Eurochem BGD Sp. z o.o.

octan etylu, Lab-Scan

acetonitryl, Lab-Scan

etanol absolutny, POCh S.A.

metanol, Lab-Scan

chloroform, POCh S.A.

n-heksan, Lab-Scan

tetrahydrofuran, Lab-Scan

czterochlorek węgla, POCh S.A.

sulfotlenek dimetylowy (DMSO), Merck

#### **fotosensybilizatory:**

róż bengalski (Rb), Aldrich

5,10,15,20-tetrafenylo-21H,23H-porfina (TPP), Aldrich

5,10,15,20-tetrafenylo-21H,23H-porfina cynkowa (Zn-TPP), Sigma-Aldrich

#### **lipidy chloroplastowe:**

monogalaktozydylodiacyloglicerol (MDGD)

digalaktozydylodiacyloglicerol (DGDG)

sulfochinowozydylodiacyloglicerol (SQDG)

fosfatydyloglicerol (PG)

#### **pozostałe odczynniki:**

odczynnik Emeric- Engel (0,2% wodny roztwór  $\text{FeCl}_3$  i 0,5% etanolowy roztwór 2,2'-bipirydylu, 1:1, v/v)

$\text{Al}_2\text{O}_3$  (złóże do chromatografii kolumnowej), Serva Feinbiochemica GMBH & Co.

MES (kwas 2-[N-morfolino]-etanosulfonowy), Sigma

dichlorowodorek N,N,N',N'-tetrametylo-p-fenylendiamina (TMPD), Sigma

p-fenylendiamina (PPD), Sigma

## 2. Materiały i metody

---

pirazolan (4-(2,4-dichlorobenzoyl)-1,3-dimetyl-pirazol-5-yl tolueno-4-sulfonian), Wako Pure Chemicals

tetranitrometan (TNM), Sigma

2,2' –azo-bis(2-amidynopropan) (AAPH), Polysciences, Inc.

2,2' –azo-bis(2,4-dimetylowaleronitryl) (AMVN), Wako Pure Chemicals

### 2.2. Aparatura

**HPLC** - układ wysokosprawnej chromatografii ciekowej z detektorem UV-VIS (model UV-970), detektorem fluorescencyjnym (Shimadzu RF10-AXL), pompą Jasco PU-980, dozownikiem ręcznym typu Rheodyne z pętlą 100  $\mu$ l oraz oprogramowaniem Borwin wersja 1.50. Rozdziały HPLC prowadzono przy użyciu następujących kolumn:

- C<sub>18</sub> z odwróconą fazą, Teknokroma (Barcelona, Hiszpania), Nucleosil 100, 250×4 mm, 5  $\mu$ m

- C<sub>30</sub> z odwróconą fazą, YMC (Europe, GmbH), 250×4,6 mm, 3  $\mu$ m

**Układ do detekcji rozdzielczej-czasowo fosforescencji przy 1270 nm** - fosforescencję <sup>1</sup>O<sub>2</sub> monitorowano przy użyciu chłodzonego ciekłym azotem detektora germanowego z przedwzmacniaczem EO817P, North Coast Scientific Corporation, USA. Wzbudzenie fotouczulacza indukowano za pomocą lasera Nd:YAG: Nd Q-switch, model Surelite II, Continuum, USA z optycznym oscylatorem parametrycznym Opotek Inc., USA.

**Układ do pomiaru fluorescencji** - fluorymetr Elmer Perkin, model LS50B, dane rejestrowano w programie FLWinLab

**Elektroda tlenowa Clarka** – firmy Hansatech (Anglia) z rejestratorem Tz 4100, Laboratori pristroje, Praga

**Spektrofotometry** – Carry Bio 400 oraz Metertek SP-830, SLM Amino DW2000 (IL, USA)

**Wirówki** – MPW-52, Eppendorf MiniSpin plus, Sigma 3K18, Janetzki K23, ultrawirówka Beckman L-7 (USA)

**Sonikator** – Cole-Parmer Instrument Company, Chicago, model 4710 (USA)

**Fitofotometr** – typ FF-01, Sonopan

### 2.3. Lipidy prenylowe

Materiał do badań stanowiły następujące lipidy prenylowe: izomery  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - oraz  $\delta$ - tokoferoli ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -Toc) i tokotrienoli ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -Tt), plastochromanol (PC), plastochinon-9

## 2. Materiały i metody

---

(PQ-9), plastochinol-9 (PQH<sub>2</sub>-9), ubichinon-10 (UQ-10), ubichinol-10 (UQH<sub>2</sub>-10),  $\alpha$ -tokoferylchinon ( $\alpha$ -TQ) oraz  $\alpha$ -tokoferylchinol ( $\alpha$ -TQH<sub>2</sub>). Zastosowane w przeprowadzonych badaniach izomery tokoferoli pochodziły z firmy Merck (Nr. 15496), natomiast izomery tokotrienoli zostały zakupione w firmie Calbiochem (Nr. 613432). PQ-9 został wyizolowany z liści klonu (*Acer platanoides*) według metody opisanej w (Kruk J.,1988). UQ-10 pochodził z firmy Hoffman-La Roche (Basel, Switzerland).  $\alpha$ -TQ otrzymano syntetycznie z  $\alpha$ -tokoferolu i oczyszczono metodą opisaną w (Kruk, 1988).

PQH<sub>2</sub>-9 i UQH<sub>2</sub>-10 otrzymano w wyniku redukcji odpowiednich chinonów za pomocą NaBH<sub>4</sub> w etanolu, natomiast  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub> uzyskano przeprowadzając analogiczną redukcję w metanolu. W celu uniknięcia utlenienia, roztwory wyjściowe zredukowanych chinonów w heksanie przechowywano w szczelnie zamkniętych fiolkach nad nasyconym wodnym roztworem ditionianu (III) sodu (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) w temperaturze -20 °C.

PC uzyskano w wyniku izolacji z naturalnego źródła, jakim są m. in. oleje roślinne. Dane literaturowe na temat występowania tego związku są nieliczne. Dlatego w wyborze rodzaju źródła, z którego izolowano PC pomocne okazały się przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania zawartości tego związku w olejach pochodzących z nasion różnych gatunków roślin.

W celu określenia zawartości tokochromanoli (Toc, Tt oraz PC) w badanych olejach roślinnych opracowano nową metodę analizy tych związków z zastosowaniem techniki HPLC. Umożliwia ona szybką i precyzyjną detekcję PC nawet przy bardzo niskich stężeniach tego związku w analizowanych próbkach, a jednocześnie zapewnia dobry rozdział PC od pozostałych tokochromanoli.

Ponieważ PC nie jest dostępny komercyjnie, opracowano nową metodę izolacji tego związku na skalę preparatywną z oleju lnianego przy zastosowaniu chromatografii kolumnowej, krystalizacji i chromatografii cienkowarstwowej (TLC).

### 2.3.1. Izolacja preparatywna PC

Mieszaninę 100 ml (80g) oleju lnianego (pochodzącego z lokalnego supermarketu) i 400 ml heksanu rozdzielano na kwaśnym tlenku glinu (stopień aktywności I). Średnica kolumny wynosiła 30 mm, natomiast objętość złoża około 150 ml. Obecne w oleju triacyloglicerole wymyło przy użyciu 750 ml heksanu, natomiast frakcję zawierającą PC i tokoferole eluowano używając 1200 ml mieszaniny chloroform/heksan (25:75, v/v). Po odparowaniu rozpuszczalnika, frakcję zawierającą PC rozpuszczono w 100 ml heksanu i ponownie poddano chromatografii kolumnowej w mieszaninie chloroform/heksan (25:75, v/v). Po kolejnym odparowaniu

## 2. Materiały i metody

---

rozpuszczalnika, frakcję PC rozpuszczono w 20 ml metanolu i pozostawiono przez noc do krystalizacji w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ . Następnie, po odwirowaniu (wirówka Janetzki K-23, 5 min. x 3000 obr/min.) nadsącz zachowano do analizy, natomiast osad rozpuszczono powtórnie w 20 ml metanolu i poddano ponownej krystalizacji w warunkach opisanych powyżej. Procedurę tę powtórzono dwukrotnie. Nadsącz po drugiej i trzeciej krystalizacji, zawierający PC, po odparowaniu metanolu poddano dalszemu oczyszczaniu metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytkach z żelem krzemionkowym F<sub>254</sub> o wymiarach 200×200 mm i grubości 1 mm (Merck). Na każdą płytkę nałożono ok. 200 mg preparatu zawierającego PC i rozwijano je mieszaniną chloroform/heksan (75:25, v/v). Lokalizację prążków z PC określono wykorzystując własności fluorescencyjne tego związku. Po oświetleniu płytki lampą UV obserwowano ciemno-fioletowy prążek ( $R_f = 0,75$ ) odpowiadający PC. Dodatkowo lokalizację prążka z PC potwierdzono przy użyciu odczynnika Emmerie-Engel wg metody opisanej w (Barr i Crane, 1971). W skład odczynnika wchodzi  $\text{FeCl}_3$  oraz 2,2'-bipirydył. Oznaczenie polega na redukcji jonów  $\text{Fe}^{3+}$  do  $\text{Fe}^{2+}$  przez chromanole, zaś obecny w środowisku bipirydył tworzy z jonami  $\text{Fe}^{2+}$  różowy kompleks. Czystość otrzymanego preparatu weryfikowano spektrofotometrycznie oraz przy zastosowaniu HPLC.

### 2.4. Roztwory wzorcowe

Roztwory wzorcowe badanych chinoli prenylowych były przygotowywane w heksanie, natomiast w przypadku chromanoli - w etanolu absolutnym.

Stężenia roztworów wzorcowych badanych lipidów prenylowych wyznaczano spektrofotometrycznie w oparciu o następujące współczynniki ekstynkcji w etanolu absolutnym:  $\epsilon_{255} = 17940$  dla PQ-9,  $\epsilon_{290} = 3390$  dla PQH<sub>2</sub>-9,  $\epsilon_{268} = 18830$  dla  $\alpha$ -TQ,  $\epsilon_{287} = 3110$  for  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub>, (Kruk i in., 1992), oraz  $\epsilon_{275} = 14020$  dla UQ-10,  $\epsilon_{290} = 4460$  dla UQH<sub>2</sub>-10,  $\epsilon_{292} = 3260$  dla -Toc,  $\epsilon_{296} = 3720$  dla -Toc,  $\epsilon_{298} = 3810$  dla -Toc i  $\epsilon_{298} = 3510$  dla -Toc (Dowson i in., 1993). W celu wyznaczenia stężeń tokotrienoli, wykorzystano odpowiednich tokoferoli, natomiast dla oznaczenia stężenia PC zastosowano współczynnik ekstynkcji -Toc.



### 2.5. Analiza zawartości chromanoli w olejach roślinnych

Analizę chromanoli przeprowadzono w olejach roślinnych pochodzących z 21 gatunków roślin: lnu (*Linum usitatissimum*) („Linolia”, „Oleofarm”, „Eurolen”, „Vigean”), oliwek (*Olea europea*) („Due Angeli”), rzepaku (*Brassica napus*) („Kuchcik”, „Primus”), maku (*Papaver somniferum*) („Vigean”), konopi (*Cannabis sativa*) („Vigean”), krokoszu (*Carthamus tinctorius*) („Vigean”), orzechów laskowych (*Corylus avellana*) („Vigean”), orzechów włoskich (*Juglans regia*) („Vigean”), orzechów arachidowych (*Arachis hypogaea*) („Oleofarm”), sezamu (*Sesamum indicum*) („Oleofarm”), wiesiołka (*Oenothera Biennis*) („Oleofarm”), lnicznika (*Camelina sativa*) („Vigean”), ryżu (*Oryza sativa*) („Rizi”), pestek dyni (*Cucurbita pepo*) („Vigean”), pestek winogron (*Vitis vinifera*) (Goccia d'oro), ostropestu (*Silybum marianum*) (Efavit), kukurydzy (*Zea mays*) (Zucchi), migdałów (*Amygdalus communis*) („Bio Planète”), słonecznika (*Helianthus annuus*) („Dolores”), kokosa (*Cocos nucifera*) (Natu Organic Products), rącznika (*Ricinus communis*) (Alofarm Farmacja Polska Sp. z o.o.). Oleje pochodziły z lokalnych supermarketów i analizowane były tuż po otwarciu.

W celu oznaczenia zawartości tokoferoli i tokotrienoli w badanych olejach przygotowywano w probówce Eppendorfa (o pojemności 2ml) naważkę danego oleju o masie 5-20 mg (z dokładnością do 0,01 mg), a następnie ekstrahowano ją 1 ml mieszaniny o składzie acetonitryl/metanol/woda (72:8:1, v/v/v), wytrząsając zawartość probówki przez 15 min. w temp. 60°C. Następnie mieszaninę wirowano przez 5 min. x 12000 obr/min na wirówce firmy Eppendorf. Uzyskany w ten sposób nadsącz analizowano techniką HPLC.

W przypadku oznaczeń PC w analizowanych olejach, stosowano naważki olejów o masie 2-6 mg i do ekstrakcji używano mieszaniny metanol/heksan (85:15, v/v).

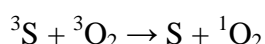
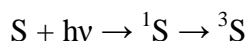
Analizę HPLC chromanoli prowadzono z wykorzystaniem kolumny C<sub>18</sub> z odwróconą fazą i detektora fluorescencyjnego przy długości fali wzbudzenia 290 nm oraz długości fali emisji 330 nm. Analizę tokoferoli i tokotrienoli prowadzono w układzie rozpuszczalników acetonitryl/metanol/woda (72:8:1, v/v/v) oraz szybkości przepływu 2 ml/min. Natomiast analizę PC prowadzono w mieszaninie metanol/heksan (85:15, v/v) i szybkością przepływu 1,5 ml/min.

Dodatkowo w celu rozdzielenia izomerów β- i γ- tokotrienoli zastosowano kolumnę C<sub>30</sub> z odwróconą fazą w układzie rozpuszczalników acetonitryl/metanol/woda (72:8:1, v/v/v) oraz szybkością przepływu 1 ml/min.

Identyfikację badanych tokochromanoli przeprowadzono w oparciu o czasy retencji standardów.

### 2.6. Wyznaczanie stałych szybkości wygaszania tlenu singletowego ( $k_Q$ ) przez badane lipidy prenylowe metodą rozdzielczej czasowo fosforescencji tlenu singletowego

Generację  $^1O_2$  w badanym układzie prowadzono metodą fotosensybilizowanego transferu energii ze stanu trypletowego wzbudzonej cząsteczki fotouczulacza ( $^3S$ ) na tlen cząsteczkowy w stanie podstawowym ( $^3O_2$ ):



W przeprowadzonych badaniach jako fotouczulacze stosowano róż bengalski (Rb), bądź 5,10,15,20-tetrafenylo-21H,23H-porfina (TPP).

Wzbudzenie cząsteczek fotosensybilizatora indukowano za pomocą 5-nanosekundowego impulsu lasera przy długości fali 515 nm dla TPP, oraz 560 nm w przypadku Rb.

Pomiary prowadzono w kuwecie fluorescencyjnej (1cm×1cm) w roztworze TTP w czterochlorku węgla ( $CCl_4$ ), lub Rb w deuterowanym metanolu, acetonitrylu oraz acetonie. Stężenie fotouczulaczy kontrolowano spektrofotometrycznie, mierząc ich absorbancję przy długości fali promieniowania wzbudzającego. Absorbancja Rb wynosiła ok. 0,25, natomiast absorbancja TPP - ok. 0,05. Tak dobrane długości fali wzbudzenia oraz stężenia fotouczulaczy miały na celu zapewnienie największej wydajności generacji  $^1O_2$  w układzie i zarazem zminimalizowanie wkładu absorpcji samych wygaszaczy. Mierzono kinetykę zaniku luminescencji próbki po impulsie lasera bez oraz z dodatkiem wygaszacza  $^1O_2$  (badanego lipidu prenylowego). Pomiary prowadzono, zwiększając za każdym razem stężenie wygaszacza, dopóki nie obserwowano wyraźnego skrócenia czasu życia fosforescencji  $^1O_2$ . Roztwór wyjściowy wygaszacza, który dodawany był do badanego roztworu, przygotowany był w tym samym rozpuszczalniku co próbka, natomiast objętość dodawanego wygaszacza stanowiła 0,2-20% objętości próbki (2 ml), w zależności od stężenia wyjściowego zastosowanego wygaszacza (2-10 mM) oraz jego wydajności wygaszania. Następnie przy użyciu programu Analysis do zebranych punktów pomiarowych zaniku intensywności emisji  $I$  w czasie  $t$  dopasowano krzywą eksponencjalną:

$$I(t) = I_0 \exp(kt)$$

## 2. Materiały i metody

---

, gdzie  $I_0$  to początkowa intensywność fosforescencji, natomiast  $k$  [ $s^{-1}$ ]- stała szybkości zaniku fosforescencji  $^1O_2$ .

Stałą szybkości wygaszania  $^1O_2$  przez badane lipidy prenylowe ( $k_Q$  [ $M^{-1}s^{-1}$ ]) wyznaczano poprzez wykreślenie zależności szybkości zaniku fosforescencji  $^1O_2$  ( $k$ ) od stężenia wygaszacza [Q] zgodnie z równaniem:

$$k = k_0 + k_Q[Q]$$

, gdzie  $k_0$  jest stałą szybkości zaniku fosforescencji  $^1O_2$  w samym rozpuszczalniku. Wszystkie pomiary prowadzono w temperaturze  $21 \pm 2^\circ C$ .

### 2.7. Izolacja i identyfikacja produktów reakcji lipidów prenylowych z $^1O_2$

Reakcję lipidów prenylowych z  $^1O_2$  prowadzono w kuwecie kwarcowej, umieszczonej na mieszadle magnetycznym. Próbkę zawierającą fotosensybilizator ( $A_{560} \sim 1$  dla Rb,  $A_{515} \sim 0,25$  dla TPP) oraz testowany wygaszacz  $^1O_2$  o stężeniu końcowym 100-500  $\mu M$  oświetlano przez 5-15 min. światłem o intensywności 50-1500  $\mu mol$  fotonów  $m^{-2} s^{-1}$ . Produkty utleniania lipidów prenylowych przez  $^1O_2$  rozdzielano i izolowano przy zastosowaniu analitycznej i preparatywnej HPLC. Szczegółowe informacje dotyczące warunków analizy umieszczono w opisie chromatogramów (rozdział 3.4. Rys. 21, Rys. 23A, B, Rys. 24, Rys. 27).

Wyizolowane związki następnie analizowano za pomocą spektroskopii absorpcyjnej (spektrofotometr Cary Bio 400) oraz spektrometrii mas (Esquire 3000, Bruker Daltonics, Brema, Niemcy). Jonizację próbek przeprowadzono techniką elektrorozpylania. Próbki nakładano w metanolu.

Detekcję tokoferylochinonów, potencjalnych produktów reakcji tokochromanoli z  $^1O_2$ , prowadzono z użyciem redukującej postkolumny cynkowej i detektora fluorescencyjnego wg (Kruk i in., 2008). Jako eluent zastosowano metanol zawierający 10 mM  $ZnCl_2$ , 5 mM octan sodowy oraz 5 mM kwas octowy. Szybkość przepływu wynosiła 1 ml/min.

### 2.8. Detekcja $^1O_2$ z wykorzystaniem 6-difenylo-1,3,5-heksatrienu (DPH)

Układem modelowym, w którym testowano przydatność DPH do wykrywania  $^1O_2$  były liposomy zbudowane z lipidów chloroplastowych o następującym składzie: monogalaktozylo-

## 2. Materiały i metody

---

diacyloglicerol (MGDG), digalaktozydylodiacylglicerol (DGDG), sulfochinowozydylodiacylglicerol (SQDG), fosfatydylglicerol (PG) (50:25:12,5:12,5, mol/mol).

Generację  $^1\text{O}_2$  w układzie prowadzono przy użyciu fotouczulacza 5,10,15,20-tetrafenylo-21H,23H-porfiny cynkowej (Zn-TPP).

Zawiesinę liposomów uzyskiwano przez odparowanie odpowiedniej ilości etanolowego roztworu mieszaniny lipidów chloroplastowych o stężeniu wyjściowym 20 mM (stężenie końcowe lipidu w próbce 0,5 mM), roztworu Zn-TPP w tetrahydrofuranie (THF) (stężenie końcowe 1  $\mu\text{M}$ ), oraz etanolowego roztworu badanego lipidu prenylowego ( $\alpha$ -Toc, PC, PQH<sub>2</sub>-9) bądź wygaszacza tlenu singletowego (TMPD – dichlorowodorek N,N,N',N'-tetrametylo-*p*-fenylenodiaminy, PPD– *p*-fenylenodiaminy) (proporcja lipidu chloroplastowego do lipidu prenylowego/wygaszacza  $^1\text{O}_2$  - 20:1). i rehydratacji otrzymanej mieszaniny wodą destylowaną (2 ml). Do tak przygotowanej próbki wprowadzano roztwór DPH w THF uzyskując stężenie końcowe 2  $\mu\text{M}$ . W przypadku próbek z dodatkiem PQH<sub>2</sub>-9, ze względu na łatwość utleniania się tego związku, wszystkie czynności prowadzone były pod strumieniem azotu.

Następnie przygotowaną próbkę inkubowano w ciemności, w temperaturze pokojowej przez 15 h przy ciągłym mieszaniu. Po inkubacji próbkę oświetlano światłem o natężeniu 100  $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  przez 2 h. Objętość 200  $\mu\text{l}$  zawiesiny pobierano po czasie 0 min., 1h i 2h, i dodawano 1800  $\mu\text{l}$  THF. Następnie mierzono widma emisyjne DPH na fluorymetrze, przy zastosowaniu następujących parametrów:  $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ , zakres 370-550 nm, szczeliny: 5 nm i 10 nm (wzbudzenie, emisja), prędkość skanowania 100 nm/min.

### 2.9. Detekcja $^1\text{O}_2$ w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* za pomocą DPH oraz oznaczanie poziomu lipidów prenylowych w jego komórkach

#### 2.9.1. Warunki hodowli

Hodowle glonu *Chlamydomonas reinhardtii* prowadzone były w temperaturze 25°C, w świetle o niskim natężeniu (70  $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Glony hodowano na pożywce BG-11, którą stanowiły rozpuszczone w wodzie destylowanej następujące sole (w ilości na 1 litr pożywki): 1,44 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,72 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,02 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 50 mg EDTA, 22 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 11,4 mg H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 5,06 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 4,98 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,61 mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1,57 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1,10 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O.

### 2.9.2. Przebieg eksperymentu

Do doświadczeń używano około 10-cio dniowych hodowli, w których stężenie chlorofilu nie przekraczało 30  $\mu\text{g/ml}$ . Hodowle o żądanych parametrach rozcieńczono pożywką tak, aby stężenie chlorofilu wynosiło 6  $\mu\text{g/ml}$ , a następnie po 30 ml zawiesiny glonów przenoszono do butelek przeznaczonych do hodowli komórkowych (o pojemności 50 ml). Do jednej hodowli dodawano roztwór inhibitora syntezy lipidów prenylowych - pirazolanu (4-(2,4-dichlorobenzoyl)-1,3-dimetyl-pirazol-5-yl tolueno-4-sulfonian) w DMSO (stężenie końcowe 5  $\mu\text{M}$ ), do drugiej (hodowli kontrolnej) dodawano wyłącznie DMSO o objętości równej tej dodanej wraz z inhibitorem. Hodowle inkubowano przez 18 h, w temperaturze 25°C, w warunkach słabego światła (ok. 70  $\mu\text{mol fotonów}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) przy ciągłym mieszaniu i przedmuchiwaniami powietrzem wzbogaconym w CO<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub> obj.) z butli.

Po tym czasie ponownie mierzono stężenie chlorofilu w hodowli kontrolnej i tej z dodatkiem inhibitora. Stężenie chlorofilu w hodowlach kontrolnych zazwyczaj wahało się w zakresie 14,5-18  $\mu\text{g/ml}$ , natomiast w hodowlach z dodatkiem inhibitora poziom chlorofilu wynosił 12-14  $\mu\text{g/ml}$ . Następnie hodowle rozcieńczano tak, aby stężenie chlorofilu w obu hodowlach wynosiło 10  $\mu\text{g/ml}$ . Do obu hodowli wprowadzano roztwór DPH w THF (stężenie końcowe 5  $\mu\text{M}$ ) i inkubowano przez 1h, przy ciągłym mieszaniu i przedmuchiwaniami powietrzem z CO<sub>2</sub>. Następnie, w celu usunięcia nadmiaru DPH z hodowli, zawiesinę komórek glonów wirowano przez 2 min x 3000 obr./min. (wirówka Janetzki K-23), osad komórek przenoszono do świeżej porcji pożywki i dodawano roztwór inhibitora w DMSO, bądź czysty DMSO do odpowiedniej hodowli.

Tak przygotowane zawiesiny komórek glonów oświetlano silnym światłem (1500 fotonów  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) przez 2h, w warunkach jak opisano powyżej. Pobierane w czasie oświetlania hodowli silnym światłem próbki po czasie 0 min., 30 min., 1h oraz 2h analizowano na zawartość chlorofilu, DPH oraz lipidów prenylowych, tj.  $\alpha$ -Toc, PQ-9 oraz PQH<sub>2</sub>-9.

### 2.9.3. Oznaczanie stężenia chlorofilu i pomiar fluorescencji DPH

W celu wyznaczenia stężenia chlorofilu ( $a + b$ ) w analizowanych próbkach, 1 ml hodowli przenoszono do próbki Eppendorfa o poj. 2 ml i wirowano przez 3 min. x 12000 obr./min. (wirówka Eppendorf MiniSpin plus). Następnie osad komórek ekstrahowano 2 ml acetonu i ponownie wirowano przez ok. 2 min. x 12000 obr./min. Stężenie chlorofilu w otrzymanym nadsączu oznaczano spektrofotometrycznie wg następującego wzoru (Lichtenthaler, 1987):

## 2. Materiały i metody

---

$$C_{a+b} = 7,05A_{661,6} + 18,09A_{644,8}$$

Uzyskany nadsącz wykorzystywany był także do pomiaru zawartości DPH w analizowanych próbkach. Po przeniesieniu nadsączu do kuwety fluorescencyjnej mierzono widma emisyjne DPH przy użyciu fluorymetru Perkin-Elmer i zastosowaniu następujących parametrów:  $\lambda_{ex} = 355$  nm, zakres skanowania 370-550 nm, szczeliny: 5 nm i 10 nm (wzbudzenie, emisja), prędkość skanowania 50 nm/min.

### 2.9.4. Oznaczanie zawartości lipidów prenylowych

W celu oznaczenia zawartości lipidów prenylowych 2 ml hodowli przenoszono do próbki Eppendorfa, wirowano tak jak opisano powyżej, osad ekstrahowano 0,5 ml acetonu, a następnie rozpuszczalnik odparowywano pod strumieniem azotu. Tak przygotowane próbki poddawano analizie HPLC po uprzednim rozpuszczeniu ekstraktu w 200  $\mu$ l eluentu o składzie: metanol/heksan (340/20, v/v). Następnie 100  $\mu$ l uzyskanego ekstraktu wstrzykiwano na kolumnę RP C<sub>18</sub> i analizowano z użyciem detektora absorpcyjnego przy  $\lambda = 255$  nm oraz detektora fluorescencyjnego przy  $\lambda_{ex} = 290$  nm i  $\lambda_{em} = 330$  nm, przy przepływie 1,5 ml/min.

### 2.10. Oznaczanie zawartości lipidów prenylowych w czasie stresu świetlnego w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* w obecności D<sub>2</sub>O

Do doświadczenia używano 6-9 dniowych hodowli glonów *Chlamydomonas reinhardtii*, w których stężenie chlorofilu nie przekraczało 30  $\mu$ g/ml.

W celu obserwacji zmian poziomu lipidów prenylowych w komórkach badanych glonów, eksperyment podzielono na dwa etapy. W pierwszej części doświadczenia postępowano tak jak to opisano w rozdziale 2.9.2., przy czym przed rozpoczęciem oświetlania do hodowli nie dodawano roztworu DPH a jedynie rozcieńczano hodowlę tak, aby stężenie chlorofilu wynosiło 10  $\mu$ g/ml. Pobierane w czasie oświetlania hodowli silnym światłem (1500  $\mu$ mol·fotonów m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) próbki po czasie 0 min., 30 min., 1h oraz 2h analizowano spektrofotometrycznie (metodą opisaną w rozdz. 2.9.3.) na zawartość chlorofilu oraz chromatograficznie (przy użyciu HPLC wg metody opisaną w rozdz. 2.9.4.) oznaczając poziom lipidów prenylowych, tj.  $\alpha$ -Toc, PQ-9 oraz PQH<sub>2</sub>-9 w badanych hodowlach.

W drugiej części eksperymentu w hodowli wyjściowej, której użyto w pierwszym etapie doświadczenia, oznaczono zawartości chlorofilu, następnie rozcieńczono pożywką tak, aby uzyskać stężenie chlorofilu 6  $\mu\text{g/ml}$ . Następnie przeniesiono do butelek hodowlanych (o objętości 50 ml) po 30 ml tak przygotowanej hodowli (do jednej z nich dodając roztwór pirazolanu w DMSO – stęż. końcowe 5  $\mu\text{M}$ , a do drugiej, hodowli kontrolnej, objętość DMSO odpowiadającą objętości tego rozpuszczalnika, którą wprowadzono wraz z pirazolanem). Hodowle inkubowano przez 18 h w takich samych warunkach jak w pierwszej części doświadczenia. Po tym czasie zmierzono stężenie chlorofilu w obu hodowlach (tuż przed rozpoczęciem dalszych czynności dla każdej z nich). W przypadku hodowli kontrolnej wahało się ono w zakresie 14,6-15,3  $\mu\text{g/ml}$ , natomiast dla hodowli z dodatkiem inhibitora wynosiło 9,7-12,32  $\mu\text{g/ml}$ . Przed rozpoczęciem oświetlania hodowle wirowano przez ok. 2 min. x 3000 obr/min. (wirówka Janetzki K-23), następnie komórki glonów zawieszano w pożywce, do której sporządzenia zamiast wody destylowanej użyto ciężkiej wody ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Objętość pożywki dobierano tak, aby końcowe stężenie chlorofilu w obu hodowlach wynosiło 10  $\mu\text{g/ml}$ . Do hodowli inkubowanej z pirazolanem dodawano jego nową porcję w DMSO, natomiast do hodowli kontrolnej odpowiednią objętość DMSO. Następnie, podobnie jak w pierwszej części doświadczenia, hodowle oświetlano silnym światłem ( $1500 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) przez 2 godziny, przy ciągłym mieszaniu i przedmuchując powietrzem wzbogaconym w  $\text{CO}_2$  (5%  $\text{CO}_2$  obj.) z butli. Próbkę pobierano po czasie 0 min., 30 min., 1h oraz 2h a następnie analizowano w nich zawartość lipidów prenylowych oraz chlorofilu, tak jak to opisano w rozdziale 2.9.3. oraz 2.9.4.

### **2.11. Badanie wytwarzania anionorodnikarodnika ponadtlennkowego w reakcji komórek *Chlamydomonas reinhardtii* na stres świetlny przy użyciu tetranitrometanu (TNM)**

Do doświadczenia użyto 6-cio dniowych hodowli *Chlamydomonas reinhardtii*, w których stężenia chlorofilu nie przekraczało 18, 5  $\mu\text{g/ml}$ .

Analogicznie, jak w przypadku doświadczeń opisanych powyżej, hodowlę wyjściową rozcieńczono pożywką uzyskując stężenie chlorofilu 6  $\mu\text{g/ml}$ . Następnie do dwóch butelek stosowanych do hodowli komórkowych (o objętości 50 ml) przeniesiono po 40 ml hodowli. Następnie tak przygotowane zawiesiny glonów inkubowano przez 18 h, dodając uprzednio do jednej z nich pirazolanu (stężenie końcowe 5  $\mu\text{M}$ ), drugą zaś potraktowano jako hodowlę kontrolną. Po upływie czasu inkubacji zmierzono stężenie chlorofilu w obu hodowlach (dla

## 2. Materiały i metody

---

hodowli z inhibitorem wynosiło ono 10,55- 11,8  $\mu\text{g/ml}$ , oraz 15,46-16,5  $\mu\text{g/ml}$  dla hodowli kontrolnej) i przed rozpoczęciem oświetlania hodowle rozcieńczono pożywką, doprowadzając każdą z nich do stężenia 10  $\mu\text{g/ml}$ .

W przypadku hodowli z dodatkiem inhibitora syntezy lipidów prenylowych, przed rozpoczęciem oświetlania, zawiesinę podzielono na dwie części. Do jednej z nich oraz do hodowli kontrolnej, na 10 min. przed rozpoczęciem oświetlania, dodano etanolowego roztworu tetranitrometanu (TNM) uzyskując stężenie końcowe 5  $\mu\text{M}$ . Okres inkubacji zawiesiny komórek po dodaniu TNM, jak również stężenie dodanego związku zostały zoptymalizowane doświadczalnie. Hodowle oświetlano przez 2 godziny silnym światłem (1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{fotonów m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), przy ciągłym mieszaniu i przedmuchiwaniu powietrzem wzbogaconym w  $\text{CO}_2$  (5%  $\text{CO}_2$  obj.) z butli i pobierano próbki po czasie 0 min., 30 min, 1h oraz 2h, a następnie analizowano zawartość chlorofilu i lipidów prenylowych na poszczególnych etapach doświadczenia wg metody opisanej w rozdz. 2.9.3. oraz 2.9.4..

### 2.12. Oznaczanie puli plastochinonów błonowych i pozabłonowych w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii*

Pulę plastochinonów (utlenionego i zredukowanego) oznaczano dla komórek glonów, które były zawieszone w pożywce przygotowanej w  $\text{D}_2\text{O}$ , a następnie oświetlane silnym światłem (1500  $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) przez 2 godziny. Poziom plastochinonów oznaczano w próbkach pobranych dla hodowli kontrolnej oraz tej z dodatkiem inhibitora syntezy lipidów prenylowych (o stężeniu końcowym 5  $\mu\text{M}$ ). W tym celu pobierano po 5 ml zawiesiny glonów z obu hodowli po czasie oświetlania 0 min. i 2h. Próbki pobrane w czasie 0 min., przed przystąpieniem do dalszych etapów doświadczenia, przechowywane były w lodówce. Po zebraniu wszystkich próbek zawiesinę komórek sonikowano w trybie pulsacyjnym (50% czasu) przez 1 min. Podczas prowadzenia wszystkich czynności próbki przechowywano w naczyniu z lodem. Próbki schładzano również podczas sonikacji, umieszczając je na lodzie. Tak przygotowane próbki wirowano na ultrawirówce przez 1h x 100000 g.

Po zwirowaniu nadsącz przeniesiono do probówek Falcona, zamrożono w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w zamrażarce w temperaturze  $-20^\circ\text{C}$ . Natomiast osad zawieszono w 0,5 ml (schłodzonego uprzednio do temp.  $-20^\circ\text{C}$ ) metanolu, przeniesiono do szczelnych probówek Eppendorfa, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze  $-80^\circ\text{C}$ .



## 2. Materiały i metody

---

W celu ekstrakcji plastochinonów w zebrany nadsączu, po rozmrożeniu próbek, do każdej z nich dodano po 2 ml octanu etylu (schłodzonego uprzednio do temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ ) i wytrząsano na wytrząsarce typu Vortex przez 5 min., w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ . Następnie próbki wirowano przez 6 min. x 5500 obr/min. (wirówka Sigma 3K18), w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ . Po wirowaniu otrzymano 2 fazy: górną octanową zawierającą plastochinony oraz dolną wodną. Następnie przenoszono do probówek Eppendorfa po 1 ml warstwy octanowej, rozpuszczalnik odparowywano pod strumieniem azotu i próbkę rozpuszczano w 200  $\mu\text{l}$  mieszaniny rozpuszczalników, w której prowadzono rozdział HPLC.

W przypadku próbek metanolowego ekstraktu osadu, tuż przed nałożeniem ich na kolumnę, próbkę rozmrażano, mieszano intensywnie przy użyciu wytrząsarki typu Vortex, następnie wirowano przez 30s x 12000 obr/min. (wirówka Eppendorf MiniSpin plus) i analizowano przy użyciu HPLC.

Rozdział HPLC prowadzono na kolumnie RP  $\text{C}_{18}$ , w mieszaninie rozpuszczalników: metanol/heksan (340/20, v/v), stosując szybkość przepływu 1,5 ml/min. i z zastosowaniem detekcji absorpcyjnej przy długości fali 255 nm, oraz detekcji fluorescencji przy  $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$  i  $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$ .

### 2.13. Badanie zdolności hamowania peroksydacji lipidów przez lipidy prenylowe

W przeprowadzonych badaniach w układzie modelowym, w którym testowano efektywność hamowania procesu peroksydacji lipidów przez lipidy prenylowe, były liposomy utworzone z lipidów chloroplastowych o następującym składzie: monogalaktozydylodiacylglicerol (MGDG), digalaktozydylodiacylglicerol (DGDG), sulfochinowozylodiacylglicerol (SQDG), fosfatydyloglicerol (PG) (50:25:12,5:12,5).

Reakcję peroksydacji inicjowano przez termiczny rozkład azoinicjatorów: rozpuszczalnego w wodzie 2,2'-azo-bis(2-amidynopropanu) (AAPH) na zewnątrz liposomów lub wewnątrz błon liposomowych przy użyciu rozpuszczalnego w lipidach 2,2'-azo-bis(2,4-dimetylowaleronitrylu) (AMVN).

#### 2.13.1. Pomiary wykorzystaniem AAPH

Liposomy otrzymywano wstrzykując odpowiednią objętość 20 mM roztworu etanolowego mieszaniny lipidów chloroplastowych (stęż. końcowe 0,5 mM) do 25 mM buforu

## 2. Materiały i metody

---

MES (pH = 6,5) mieszanego za pomocą mieszadła magnetycznego umieszczonego w naczynku elektrodowym. Peroksydację lipidów inicjowano dodając do zawiesiny liposomów wodny roztwór AAPH o stężeniu wyjściowym 0,5 M (stęż. końcowe 10 mM).

W przypadku pomiarów z lipidami prenyłowymi ( $\alpha$ -Toc,  $\gamma$ -Toc, PC, PQH<sub>2</sub>-9, UQH<sub>2</sub>-10,  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub>) do buforu wstrzykiwano mieszaninę lipidów chloroplastowych zawierającą odpowiednią ilość testowanego lipidu prenylowego. W przeprowadzonych doświadczeniach zastosowano trzy różne stężenia badanych lipidów prenylowych, uzyskując proporcję lipid chloroplastowy/lipid prenylowy 10:1, 50:1, bądź 250:1.

Przebieg reakcji peroksydacji monitorowano mierząc konsumpcję O<sub>2</sub> przy użyciu elektrody tlenowej Clarka. Wszystkie pomiary prowadzono w warunkach termostatowania naczynka elektrodowego (37°C).

### 2.13.2. Pomiary z wykorzystaniem AMVN

Liposomy przygotowywano metodą wstrzykiwania, w szklanej fiolce umieszczonej na mieszadle magnetycznym. Reakcję peroksydacji prowadzono w temperaturze (37°C), dlatego też przed wprowadzeniem roztworu lipidów, bufor 25 mM MES (pH = 6,5) inkubowano przez ok. 5 min. w łaźni wodnej. Czas ten był wystarczający do osiągnięcia żądanej temperatury buforu.

Następnie do buforu wstrzykiwano odpowiednią objętość mieszaniny lipidów chloroplastowych w etanolu o stężeniu wyjściowym 20 mM (stęż. końcowe 0,5 mM) i 15 mM etanolowy roztwór AMVN (stęż. końcowe 100  $\mu$ M).

Przygotowywanie liposomów z lipidami prenyłowymi ( $\alpha$ -Toc,  $\gamma$ -Toc, PC, PQH<sub>2</sub>-9) rozpoczynano od sporządzenia mieszaniny lipidów chloroplastowych z analizowanym lipidem prenylowym w etanolu, do której dodawano roztwór generatora reakcji peroksydacji tuż przed wstrzyknięciem mieszaniny lipidów do buforu. W przeprowadzonych doświadczeniach zastosowano dwa stężenia badanych lipidów prenylowych - 10  $\mu$ M i 2  $\mu$ M (proporcja lipid chloroplastowy: lipid prenylowy, 50:1 oraz 250:1).

W czasie reakcji (0 min. – 5h) pobierano próbki co 30 min. przenosząc po 100  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej do próbki Eppendorfa o pojemności 1,5 ml. Do próbki dodawano 600  $\mu$ l uprzednio schłodzonego (-20 °C) octanu etylu i ekstrahowano mieszaninę wytrząsając na wytrząsarce typu Vortex przez 5 min. Po tym czasie próbki wirowano przez 5 min. x 14000 obr/min. (wirówka Eppendorf MiniSpin plus). Następnie 450  $\mu$ l nadsącza przenoszono do nowej próbki Eppendorfa i odparowywano do sucha pod strumieniem azotu. W tak przygotowanych próbkach analizowano zawartość nadtlenków lipidów chloroplastowych (LOOH) oraz lipidów

## 2. Materiały i metody

---

prenylowych (w przypadku próbek z liposomami z wbudowanymi lipidami prenylowymi) metodą HPLC. Bezpośrednio przed nałożeniem na kolumnę, zawartość próbki rozpuszczano w 150  $\mu$ l eluentu (300  $\mu$ l w przypadku próbek z dodatkiem PC), w którym prowadzono rozdział. Detekcję LOOH prowadzono przy użyciu detektora absorpcyjnego przy  $\lambda = 234$  nm, natomiast stężenie lipidów prenylowych monitorowano przy zastosowaniu detektora fluorescencyjnego ( $\lambda_{\text{ex}} = 290$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 330$  nm). Rozdział prowadzono w mieszaninie rozpuszczalników acetonitryl/metnol/woda (72:8:1, v/v/v) przy szybkości przepływu 1,5 ml/min.

W przypadku próbek z dodatkiem PC, ze względu na długi czas retencji tego związku (powyżej 60 min.) w układzie rozpuszczalników acetonitryl/metnol/woda, analizę prowadzono w dwóch układach: acetonitryl/metnol/woda (72/8/1, v/v/v) dla oznaczenia LOOH oraz metanol/heksan (340/20, v/v) dla oznaczenia zawartości PC, z zastosowaniem szybkości przepływu 1,5 ml/min. w obu przypadkach.

### 3. Wyniki

### 3. Wyniki

#### 3.1. Zawartość chromanoli w olejach roślinnych

Spośród wszystkich badanych w tej pracy lipidów prenylowych, najslabiej poznanym związkiem, zarówno pod względem jego funkcji jak i dystrybucji w tkankach roślinnych, jest PC. Do przeprowadzenia badań określających zdolności antyoksydacyjne tego związku konieczna była jego izolacja na skalę preparatywną, dlatego ważnym elementem badań był wybór materiału do izolacji PC. Dane literaturowe wskazują, że wysoką zawartością tego

**Tabela 3. Zawartość tokoferoli, tokotrienoli i plastochromanolu w olejach roślinnych.**

olej	Toc (mg/ 100g oleju)			Tt (mg/ 100g oleju)			PC (mg/100g oleju)
	$\alpha$	$\beta+\gamma$	$\delta$	$\alpha$	$\beta+\gamma$	$\delta$	
<sup>a</sup> liniany "Linolia"	0,25	21,35	0,33	śl	śl	-	21,88
<sup>a</sup> liniany "Vigean"	0,38	23,24	0,34	śl	0,13	-	17,01
<sup>a</sup> liniany "Eurolen"	1,04	40,51	0,85	0,03	0,06	-	30,15
<sup>a</sup> liniany "Oleofarm"	1,58	26,98	0,38	-	0,02	-	17,92
<sup>a</sup> oliwa z oliwek	4,22	1,04	0,03	0,07	śl	-	0,46
rzepakowy "Kuchcik"	14,19	22,45	0,52	-	0,22	-	9,08
rzepakowy "Primus"3	17,63	27,24	0,63	-	0,05	-	8,57
<sup>a</sup> z maku "Vigean"	1,99	15,51	0,23	-	0,16	-	0,11
<sup>a</sup> z konopii "Vigean"	5,27	30,46	1,07	-	0,11	-	0,16
<sup>a</sup> krokoszowy	43,75	1,33	0,33	-	0,15( $\gamma$ )	-	0,12
<sup>a</sup> z orzechów laskowych	22,22	6,88	0,41	-	0,03( $\gamma$ )	0,02	0,01
<sup>a</sup> z orzechów włoskich	7,53	23,64	2,64	-	0,09	-	0,04
<sup>a</sup> arachidowy "Oleofarm"	10,92	11,08	0,88	-	0,01( $\gamma$ )	0,03	1,95
<sup>a</sup> sezamowy "Oleofarm"	-	14,03	0,30	-	śl	-	-
<sup>a</sup> z wiesiołka "Oleofarm"	7,48	27,39	0,52	-	0,01( $\gamma$ )	-	0,15
<sup>a</sup> z lnicznika	1,82	44,75	0,98	0,30	0,08	-	4,30
ryżowy "Rizi"	4,93	4,74	0,30	7,76	9,99	-	0,11
<sup>a</sup> z pestek dyni "Vigean"	-	19,78	0,80	-	-	-	0,05
z pestek winogron	28,18	17,30	0,88	1,58	1,21( $\gamma$ )	-	1,31
<sup>a</sup> silimarolowy "Vigean"	19,33	5,21	0,61	0,87	0,37	0,10	0,24
<sup>a</sup> kukurydziany	17,10	85,09	6,55	1,14	1,17( $\gamma$ )	0,12	1,69
<sup>a</sup> z migdałów "Bio Planete"	46,12	4,41	0,66	0,46	0,11	-	0,18
słonecznikowy "Dolores"	59,37	7,95	1,33	0,04	0,07	-	0,25
kokosowy	0,36	0,21	0,03	0,34	0,17	-	-
rycynowy	1,30	34,46	28,50	-	0,05	0,02	0,11

SD dla n = 3 stanowił  $\leq 5$  i  $\leq 20\%$  dla zawartości tokochromanoli odpowiednio powyżej i poniżej 1mg/100 g oleju

"-" nie wykryto, śl – ilości śladowe (<0,01 mg/100 g oleju), ( $\gamma$ )- w pomiarach z użyciem kolumny C<sub>30</sub> wykryto tylko  $\gamma$ -Tt

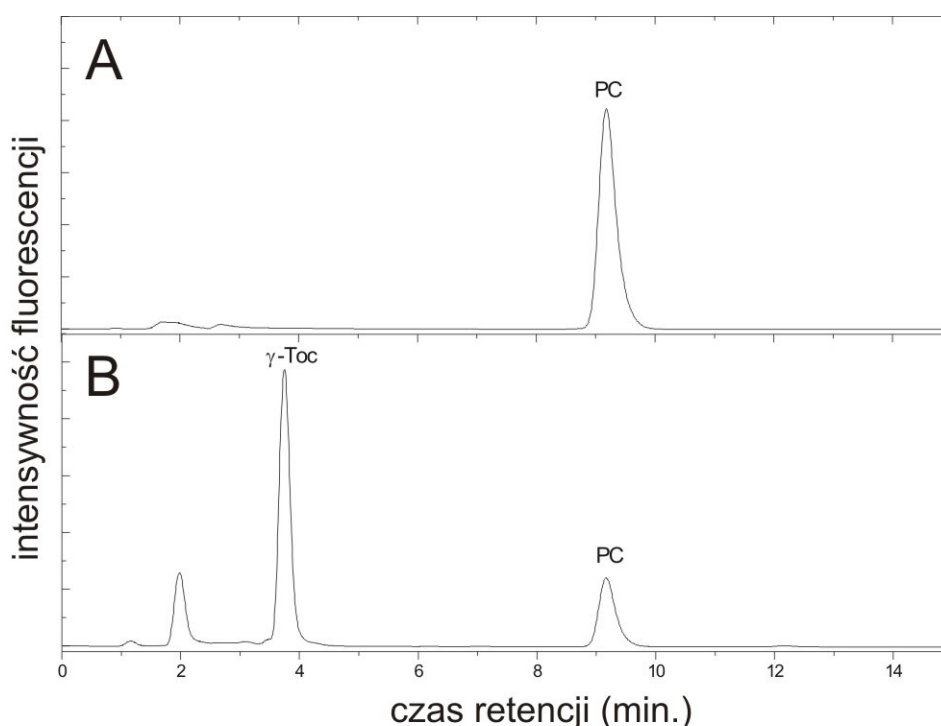
<sup>a</sup> tłoczone na zimno

### 3. Wyniki

związku charakteryzują się niektóre oleje roślinne (lniany i rzepakowy, Balz i in., 1992; Goffman i Möllers, 2000; Velasco i Goffman, 2000; Ahmed i in., 2005). Stąd w celu wytypowania najbogatszego źródła PC do izolacji preparatywnej przeprowadzono analizę zawartości tego związku oraz pozostałych chromanoli w komercyjnie dostępnych olejach roślinnych, pochodzących z różnych gatunków roślin.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że wśród analizowanych olejów najwyższą zawartością PC charakteryzowały się oleje lniane (17,01 – 30,15 mg/100 g oleju) (Tabela 3). Wysoką zawartość PC wykazywały także olej rzepakowy i olej z lnicznika. Pozostałe oleje miały zdecydowanie niższą zawartość tego związku. Obecności PC nie stwierdzono jedynie w przypadku oleju sezamowego i kokosowego (Tabela 3).

Układ HPLC zastosowany do oznaczenia zawartości PC w analizowanych próbkach charakteryzował się relatywnie krótkim czasem retencji PC oraz dobrą separacją tego związku od pozostałych tokochochromanoli. Przykładowy rozdział HPLC z zastosowaniem tego układu przedstawiono poniżej (Rys. 15).



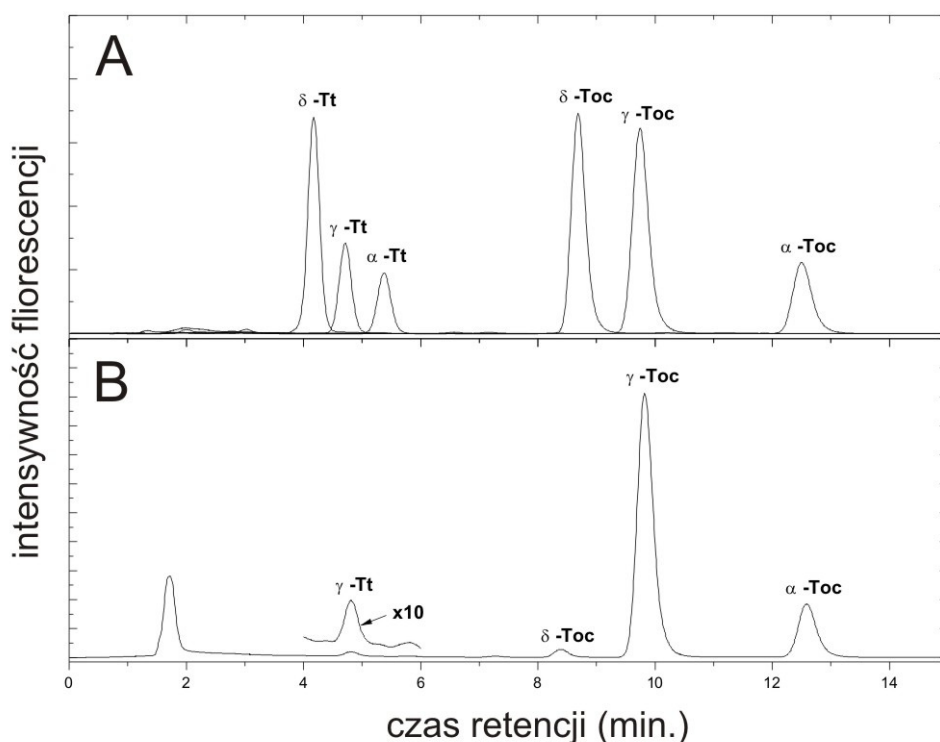
**Rys. 15.** Chromatogramy wzorca PC (A) oraz oleju lnianego "Eurolen" (B). Warunki rozdzielania HPLC: kolumna RP C<sub>18</sub>, eluent: metanol/heksan (85/15, v/v), przepływ 1,5 ml/min., detekcja fluorescencyjna  $\lambda_{\text{ex}} = 290$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 330$  nm.

Analiza zawartości izomerów tokoferoli wykazała, że  $\gamma$ -Toc dominował w większości olejów, z wyjątkiem oliwy z oliwek, oleju krokoszowego, oleju z orzechów laskowych, oleju z pestek winogron, oleju silimarolowego, oleju z prażonych migdałów i oleju słonecznikowego.

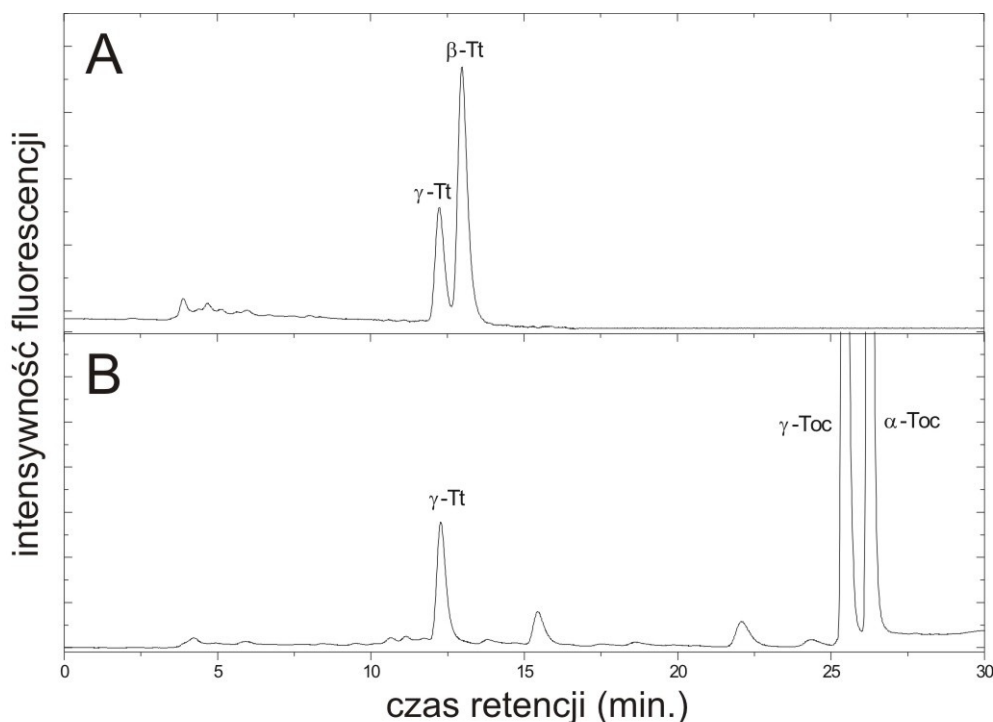
### 3. Wyniki

(Tabela 3). W przypadku oleju arachidowego, zawartości  $\alpha$ - i  $\gamma$ -Toc były jednakowe. Natomiast najwyższą zawartość  $\delta$ -Toc stwierdzono w przypadku oleju rycynowego.

Układ HPLC z kolumną  $C_{18}$  z odwróconą fazą, umożliwiającą jednoczesną detekcję tokoferoli i tokotrienoli w badanych próbkach (Rys. 16) nie dawał wystarczającej rozdzielczości dla izomerów  $\beta$ - i  $\gamma$ -Tt. Dopiero zastosowanie kolumny  $C_{30}$  z odwróconą fazą pozwoliło na rozdzielenie obu tych izomerów. Przykładowe rozdziały z wykorzystaniem tego układu przedstawia Rys. 17.



**Rys. 16.** Chromatogramy standardów tokoferoli i tokotrienoli (A) oraz oleju rzepakowego "Kuchcik" (B). Warunki rozdziału HPLC: kolumna RP  $C_{18}$ , eluent: acetonitryl/metanol/woda (72/8/1, v/v/v), przepływ 2 ml/min., detekcja fluorescencyjna  $\lambda_{ex} = 290$  nm,  $\lambda_{em} = 330$  nm.



**Rys. 17.** Chromatogramy standardów  $\beta$ - i  $\gamma$ -tokotrienolu (A) oraz oleju z pestek winogron (B). Warunki rozdzielania HPLC: kolumna RP C<sub>30</sub>, eluent: acetonitryl/metanol/woda (72/8/1, v/v/v), przepływ 1 ml/min., detekcja fluorescencyjna  $\lambda_{\text{ex}} = 290$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 330$  nm.

Spośród analizowanych olejów najwyższą zawartość tokotrienoli wykazywał olej ryżowy (Tabela 3). Pozostałe oleje charakteryzowały się zdecydowanie niższą zawartością tokotrienoli. Wśród nich najwyższy poziom tokotrienoli stwierdzono w olejach: z pestek winogron, silimarolowym i kukurydzianym. Wyniki uzyskane po zastosowaniu układu z kolumną RP C<sub>30</sub>, wykazały obecność jedynie  $\gamma$ -Tt w badanych olejach (Tabela 3, Rys. 17).

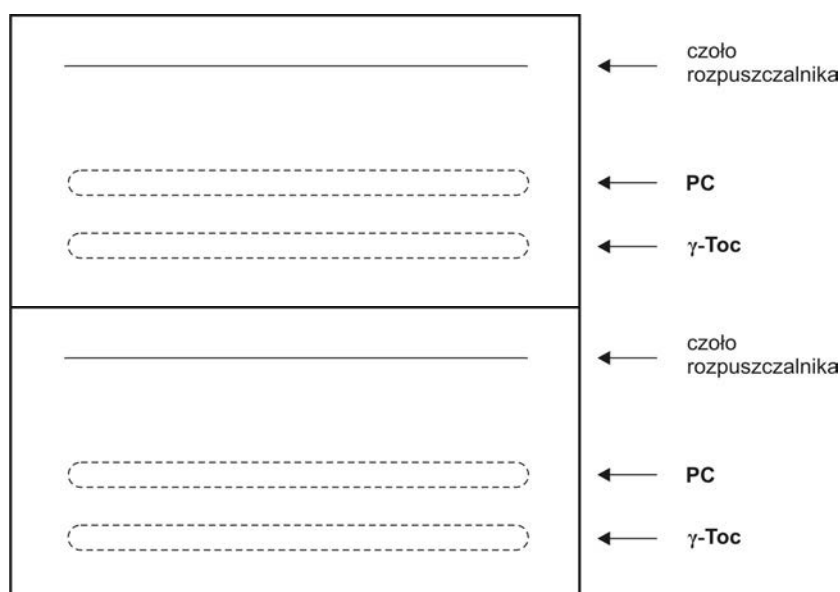
#### 3.2. Preparatyka plastochromanolu

W celu uzyskania PC do badań nad jego zdolnościami antyoksydacyjnymi, przeprowadzono izolację PC z oleju lnianego „Eurolen”. Wybór źródła oparto o wyniki analizy PC w olejach roślinnych, wśród których olej „Eurolen” charakteryzował się najwyższą zawartością tego związku (Tabela 3). Ze względu na małą wydajność publikowanych wcześniej metod izolacji PC (Whittle i in., 1965; Olejnik i in., 1997), opracowano nową technikę izolacji tego związku z olejów roślinnych.

Pomimo wysokiej zawartości w oleju „Eurolen” (30,15 mg/100 g oleju, Tabela 3), PC stanowi zaledwie 0,03% całkowitej masy tego źródła. Stąd uzyskanie preparatu o wysokiej czystości wymagało zastosowania kilku etapów oczyszczania i odpowiedniej ilości materiału

### 3. Wyniki

wyjściowego (100 ml oleju, co odpowiada 80g). Poddanie oleju „Eurolen” chromatografii kolumnowej (z zastosowaniem kolumny ze złożem w postaci  $Al_2O_3$ , stopień aktywności I) pozwoliło na odseparowanie zdecydowanej większości składników oleju (m.in. acylogliceroli, Toc, Tt) i uzyskanie preparatu wzbogaconego w PC. Po dwukrotnym oczyszczaniu techniką chromatografii kolumnowej, z 80g surowca otrzymano surowy preparat z PC o masie 1,27g. Zastosowanie krystalizacji z metanolu umożliwiło dalsze wzbogacanie preparatu w PC (463,49mg).



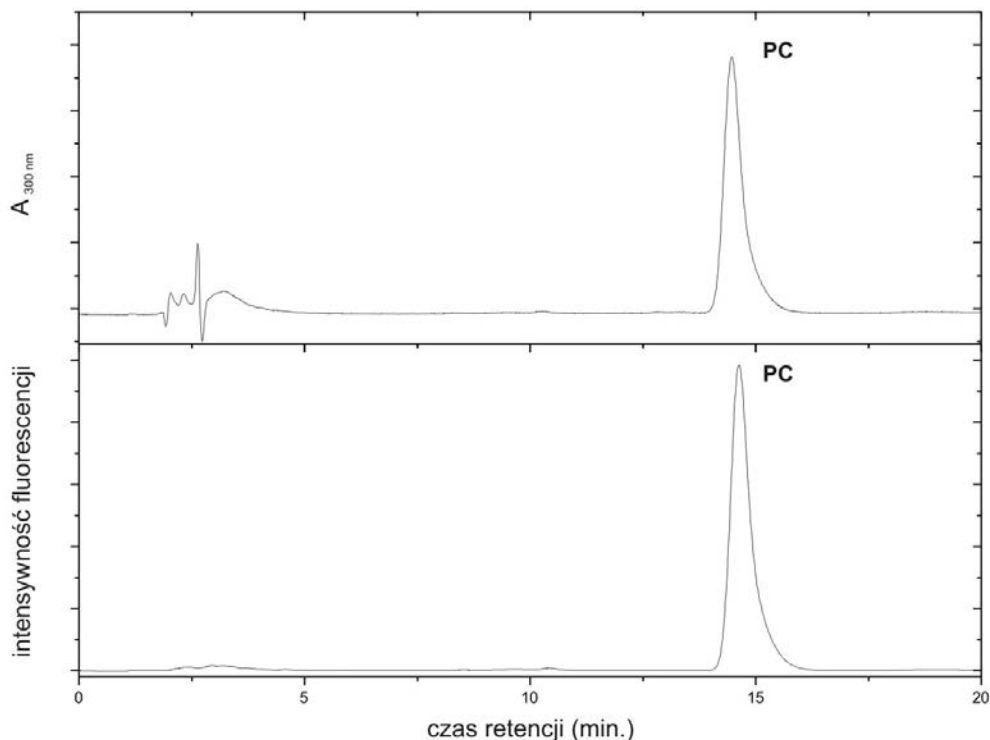
**Rys. 18.** Schemat chromatogramu cienkowarstwowego preparatu z PC otrzymanego z oleju lnianego „Eurolen”. Rozdział prowadzono na płytce z żelom krzemionkowym  $F_{254}$  o wymiarach  $200 \times 200$  mm i grubości 1 mm, przy zastosowaniu mieszaniny chloroform/heksan (75:25, v/v) jako roztworu rozwijającego.

Następnie otrzymany preparat, zawierający głównie PC oraz  $\gamma$ -Toc, oczyszczano przy użyciu chromatografii cienkowarstwowowej (TLC), z zastosowaniem jako roztworu rozwijającego mieszaniny składającej się z chloroformu i heksanu (75/25, v/v). Zastosowany układ rozpuszczalników dawał zadowalający rozdział poszczególnych składników preparatu. Na Rys. 18 przedstawiono schemat rozdziału na płytce z żelom krzemionkowym. Położenie prążka z PC określono przy użyciu lampy UV. W miejscu, gdzie znajdował się PC stwierdzono charakterystyczny ciemno-fioletowy prążek o  $R_f = 0,75$ . Dodatkowo lokalizację PC potwierdzono przeprowadzając reakcję z użyciem odczynnika Emmerie-Engel (Barr i Crane, 1971). Metoda ta ujawniła także położenie prążka odpowiadającemu  $\gamma$ -Toc. Czystość otrzymanego preparatu PC (17,14mg) zbadano przy użyciu techniki HPLC (Rys. 19) oraz spektrofotometrycznie. PC wykazywał maksima absorpcji przy 294,5 oraz 300,5 nm w izooktanie, co jest zgodne z danymi literaturowymi (Whittle i in., 1965; Thies, 1997)



### 3. Wyniki

Przedstawiona w niniejszej pracy metoda izolacji PC z oleju lnianego charakteryzuje się wysoką wydajnością (71%).



**Rys. 19.** Chromatogram preparatu z oleju lnianego zawierającego PC (25  $\mu$ M), po oczyszczeniu techniką TLC. Warunki rozdziału HPLC: kolumna RP C<sub>18</sub> eluent- metanol/heksan (340/20, v/v); przepływ 1,5 ml/min.; detekcja absorbcyjna przy  $\lambda = 300$  nm, detekcja fluorescencyjna,  $\lambda_{\text{ex}} = 290$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 330$  nm.

#### 3.3. Stałe szybkości wygaszania tlenu singletowego ( $k_Q$ ) badanych lipidów prenylowych

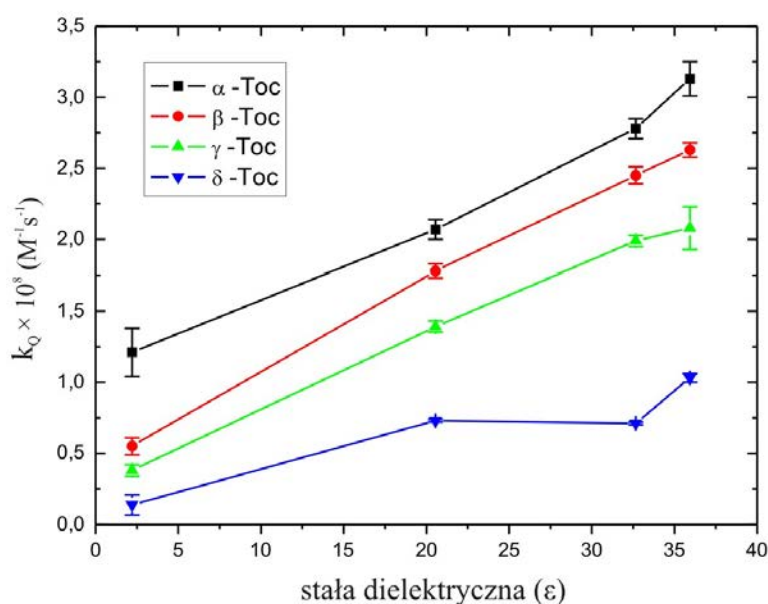
Otrzymane wyniki wykazały, że tokoferole są efektywnymi wygaszczaczami  $^1\text{O}_2$  (Tabela 4). Wśród badanych izomerów tokoferoli, we wszystkich użytych rozpuszczalnikach, najwyższą wydajność w wygaszaniu  $^1\text{O}_2$  wykazywał  $\alpha$ -Toc. Stałe szybkości wygaszania  $^1\text{O}_2$  izomerów tokoferoli malały w następującym porządku:  $\alpha$ -Toc >  $\beta$ -Toc >  $\gamma$ -Toc >  $\delta$ -Toc i były zależne od polarności zastosowanego rozpuszczalnika (Rys. 20).

### 3. Wyniki

**Tabela 4.** Stałe szybkości gaszenia tlenu singletowego,  $k_Q$  ( $M^{-1}s^{-1}$ ) przez tokoferole w rozpuszczalnikach o różnej polarności.

Tokoferol	Acetonitryl	CH <sub>3</sub> OD	Aceton	CCl <sub>4</sub>
	35,94*	32,66*	20,56*	2,2*
<b>α-Toc</b>	$3,13 \pm 0,12 \times 10^8$	$2,78 \pm 0,07 \times 10^8$	$2,07 \pm 0,07 \times 10^8$	$1,21 \pm 0,17 \times 10^8$
<b>β-Toc</b>	$2,63 \pm 0,05 \times 10^8$	$2,45 \pm 0,06 \times 10^8$	$1,78 \pm 0,05 \times 10^8$	$0,55 \pm 0,06 \times 10^8$
<b>γ-Toc</b>	$2,08 \pm 0,15 \times 10^8$	$1,99 \pm 0,04 \times 10^8$	$1,39 \pm 0,04 \times 10^8$	$0,38 \pm 0,04 \times 10^8$
<b>δ-Toc</b>	$1,03 \pm 0,03 \times 10^8$	$0,71 \pm 0,01 \times 10^8$	$0,73 \pm 0,01 \times 10^8$	$0,138 \pm 0,007 \times 10^8$

\*stała dielektryczna  
średnia  $\pm$  SD,  $n \leq 3$



**Rys. 20.** Zależność stałej szybkości gaszenia tlenu singletowego  $k_Q$  ( $M^{-1}s^{-1}$ ) przez tokoferole od stałej dielektrycznej rozpuszczalnika.

W przypadku tokotrienoli wartości  $k_Q$  były podobne do analogicznych wartości otrzymanych dla tokoferoli, z wyjątkiem stałej gaszenia  $^1O_2$  dla  $\delta$ -Tt mierzonej w CCl<sub>4</sub>, która była 2,5 krotnie wyższa w porównaniu do stałej wygaszania dla  $\delta$ -Toc wyznaczonej w tym samym rozpuszczalniku (Tabela 5).

### 3. Wyniki

**Tabela 5.** Stałe szybkości gaszenia tlenu singletowego,  $k_Q$  ( $M^{-1}s^{-1}$ ) przez tokotrienole w acetonitrylu i czterochlorku węgla.

<b>Tokotrienol</b>	<b>Acetonitryl</b>	<b>CCl<sub>4</sub></b>
<b><math>\alpha</math>-Tt</b>	$3,21 \pm 0,13 \times 10^8$	$1,58 \pm 0,27 \times 10^8$
<b><math>\beta</math>-Tt</b>	$2,49 \pm 0,12 \times 10^8$	$0,65 \pm 0,08 \times 10^8$
<b><math>\gamma</math>-Tt</b>	$1,98 \pm 0,10 \times 10^8$	$0,40 \pm 0,03 \times 10^8$
<b><math>\delta</math>-Tt</b>	$1,19 \pm 0,15 \times 10^8$	$0,35 \pm 0,01 \times 10^8$

średnia  $\pm$  SD,  $n \leq 3$

Wśród badanych chinoli prenylowych,  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub> charakteryzował się najwyższą wartością stałej wygaszania. W przypadku tego związku,  $k_Q$  była ok. 1,5-2 razy wyższa od  $\alpha$ -Toc, w zależności od polarności rozpuszczalnika. Niższą wartość  $k_Q$  wykazał UQH<sub>2</sub>-10, zaś najslabszym wygaszaczem spośród chinoli był PQH<sub>2</sub>-9 (Tabela 6).

**Tabela 6.** Stałe szybkości gaszenia tlenu singletowego,  $k_Q$  ( $M^{-1}s^{-1}$ ) dla chinoli prenylowych i PC w acetonitrylu oraz czterochlorku węgla.

<b>Lipid prenylowy</b>	<b>Acetonitryl</b>	<b>CCl<sub>4</sub></b>
<b><math>\alpha</math>-TQH<sub>2</sub></b>	$4,86 \pm 0,15 \times 10^8$	$2,40 \pm 0,52 \times 10^8$
<b>UQH<sub>2</sub>-10</b>	$1,68 \pm 0,19 \times 10^8$	$0,36 \pm 0,01 \times 10^8$
<b>PQH<sub>2</sub>-9</b>	$0,97 \pm 0,08 \times 10^8$	$0,22 \pm 0,02 \times 10^8$
<b>PQ-9</b>	$0,172 \pm 0,005 \times 10^8$	$0,063 \pm 0,004 \times 10^8$
<b>PC</b>	$2,16 \pm 0,22 \times 10^8$	$0,610 \pm 0,003 \times 10^8$

średnia  $\pm$  SD,  $n \leq 3$

Zestawiając stałe wygaszania dla  $\alpha$ -Toc i PQH<sub>2</sub>-9, dwóch lipidów prenylowych występujących w błonach tylakoidów w największej ilości, obserwujemy znaczące różnice w ich efektywności jako wygaszaczy <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. W porównaniu do  $\alpha$ -Toc, PQH<sub>2</sub>-9 okazał się ponad trzykrotnie słabszym wygaszaczem w rozpuszczalnikach polarnych oraz ponad pięciokrotnie mniej wydajnym wygaszaczem w środowisku hydrofobowym. Natomiast PQ-9, utleniona forma PQH<sub>2</sub>-9, wykazywała zdecydowanie niższe zdolności do wygaszania <sup>1</sup>O<sub>2</sub> w porównaniu do zredukowanej formy chinonu.

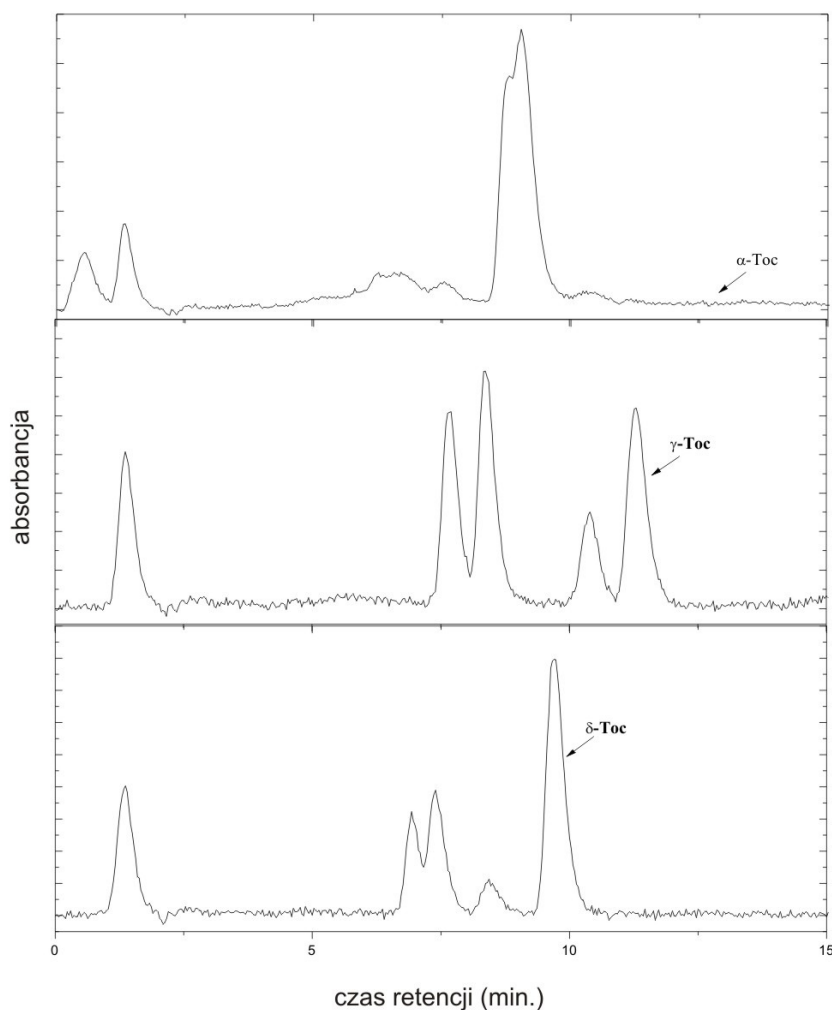
### 3. Wyniki

Stała wygaszania dla PC, homologu  $\gamma$ -Tt, w acetonitrylu była podobna do tych otrzymanych dla  $\gamma$ -Toc i  $\gamma$ -Tt oraz 1,5 razy wyższa w  $\text{CCl}_4$ .

#### 3.4. Charakterystyka produktów reakcji badanych lipidów prenylowych z tlenem singletowym

Zbadano produkty utleniania badanych lipidów prenylowych będące wynikiem reakcji chemicznej tych związków z  $^1\text{O}_2$ .

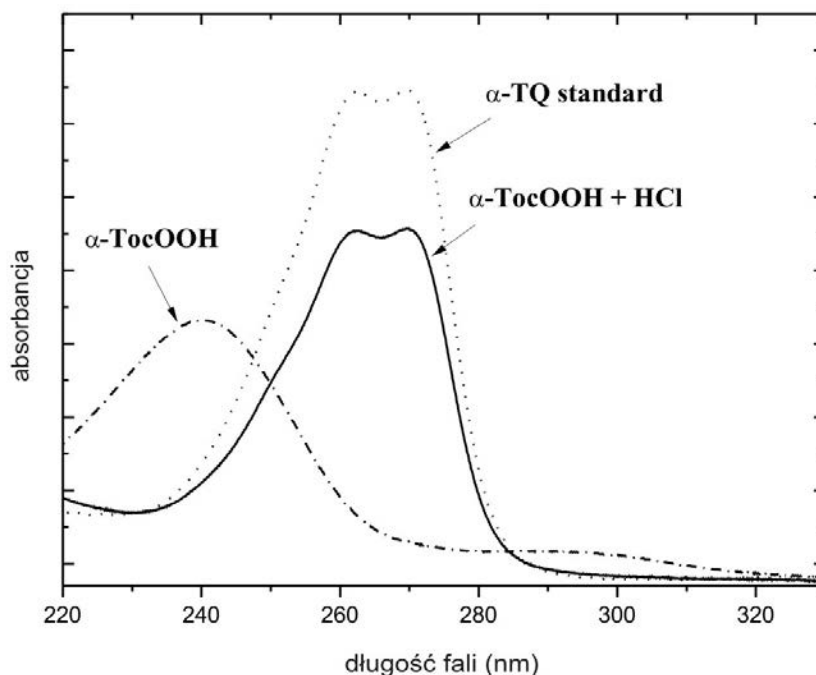
W przypadku tokoferoli pierwotnymi produktami utleniania były związki z maksimum absorpcji przy długości fali ok. 240 nm, widoczne na chromatogramie w formie podwójnego piku (Rys. 21).



**Rys. 21.** Chromatogramy tokoferoli (500  $\mu\text{M}$ ) w acetonitrylu, z użyciem Rb jako fotouczulacza, po naświetlaniu przez 15 min. światłem o natężeniu  $1500 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Warunki rozdzielania HPLC: kolumna RP  $\text{C}_{18}$  eluent-acetonitryl/metanol/woda (72/8/1, v/v/v); przepływ 1,5 ml/min.; detekcja absorpcyjna przy  $\lambda = 241 \text{ nm}$  dla  $\alpha$ -tokoferolu oraz  $\lambda = 237 \text{ nm}$  dla  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferolu.

### 3. Wyniki

Wyzolowany preparatywnie produkt utleniania  $\alpha$ -Toc, o czsie retencji 8,5 min (Rys. 21) charakteryzował się widmem z maksimum absorpcji przy długości fali 240 nm oraz obecnością dodatkowego ramienia w zakresie 280-290 nm (Rys. 22). Po zakwaszeniu próbki kształt widma zmieniał się na charakterystyczny dla widma absorpcji  $\alpha$ -TQ z  $\lambda_{\max} = 262$  nm i 269 nm.



**Rys. 22.** Widmo absorpcyjne pierwotnego produktu utleniania  $\alpha$ -tokoferolu ( $\alpha$ -TOOH), widmo tego samego związku po dodaniu HCl oraz widmo standardu  $\alpha$ -TQ wykreślone w mieszaninie: acetonitryl/metanol/woda (72:8:1, v/v).

Uzyskane dane wskazują, że pierwszym stabilnym produktem utleniania  $\alpha$ -Toc jest 8a-wodoronadtlenek- $\alpha$ -tokoferolu ( $\alpha$ -TOOH), który opisywano już w literaturze jako produkt utleniania  $\alpha$ -Toc z charakterystycznym widmem absorpcji z  $\lambda_{\max} = 235$  nm oraz ramieniem przy 275 nm w heksanie (Clough i in., 1979).

W przypadku pozostałych izomerów tokoferoli, po uprzednim zakwaszeniu analizowanych roztworów, również obserwowano formowanie się odpowiednich tokoferylochinonów z wyizolowanych pierwotnych produktów utleniania tych związków. Porównując stopień utlenienia poszczególnych tokoferoli w tych samych warunkach zaobserwowano, że izomerem najbardziej podatnym na utlenianie jest  $\alpha$ -Toc, wolniejszemu utlenieniu ulegają zaś izomery  $\gamma$ -Toc i  $\delta$ -Toc (Rys. 21), co wyraźnie koreluje z efektywnością poszczególnych tokoferoli jako wygaszaczy  $^1\text{O}_2$  (Tabela 4).

Przeprowadzono również analizę zawartości odpowiednich tokoferylochinonów w badanym układzie metodą HPLC. Otrzymane wyniki wykazały, że tokoferylochinony stanowiły

### 3. Wyniki

---

zaledwie 0,16-0,66% wyjściowej ilości tokoferoli użytej do reakcji, w zależności od izomeru poddanego reakcji.

Analiza HPLC mieszaniny reakcyjnej składającej się z UQH<sub>2</sub>-10, metanolu oraz Rb jako fotouczulacza oświetlanych światłem o wzrastającej intensywności wykazała, że UQH<sub>2</sub>-10 w pierwszej kolejności ulega utlenieniu do UQ-10 (Rys. 23A).

Następnie UQ-10 ulega dalszemu utlenianiu dając produkty o krótszym czasie retencji (4,2 i 9 min.). Widmo absorpcyjne obu tych produktów, zmierzone po izolacji preparatywnej, było identyczne z widmem absorpcji UQ-10 w heksanie ( $\lambda_{\max}$  = 271-272 nm). Następnie produkty te poddano analizie z zastosowaniem spektrometrii masowej.

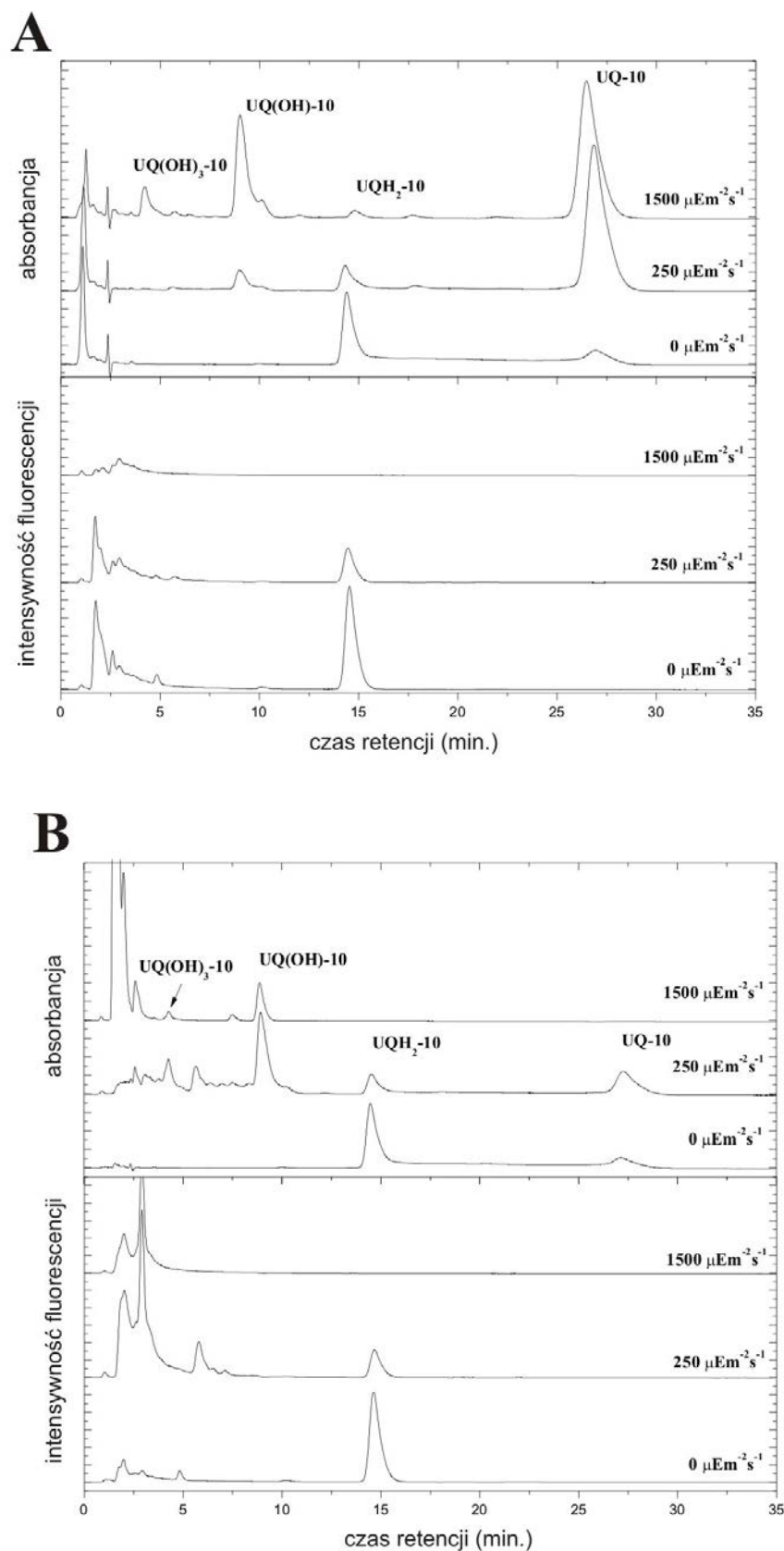
Wyniki uzyskane dla związku o czasie retencji 9 min. (Rys. 23A) wykazały, że  $m/z$  = 917,9 co odpowiada jonowi  $[M_{UQ+O+K}]^+$  i może być przypisane produktowi utlenienia UQH<sub>2</sub>-10 z jedną grupą hydroksylową w łańcuchu bocznym o wzorze UQ(OH)-10. Analiza masowa produktu utleniania o czasie retencji 4,2 min. wykazała  $m/z$  = 949,8, co odpowiada jonowi  $[M_{UQ+3O+K}]^+$ , który zidentyfikowano jako trihydroksylową pochodną UQ-10, gdzie grupy hydroksylowe zlokalizowane są w prenylowym łańcuchu bocznym (UQ(OH)<sub>3</sub>-10).

W analogicznym doświadczeniu, przeprowadzonym przy zastosowaniu CCl<sub>4</sub> jako środowiska reakcji oraz TPP jako fotouczulacza (Rys. 23B) obserwowano formowanie się tych samych produktów utleniania UQH<sub>2</sub>-10. Oba układy różniły się jednak szybkością przekształcania substratu reakcji w produkty.

W czterochlorku węgla, UQH<sub>2</sub>-10 szybciej ulegał utlenieniu, co było szczególnie widoczne w próbkach oświetlanych światłem o wysokiej intensywności (1500  $\mu\text{mol}$  fotonów  $\text{m}^{-2}$   $\text{s}^{-1}$ ), gdzie obserwowano tworzenie się głównie produktów o wyższej polarności, przemieszczających się wraz z czołem eluentu.

Oświetlanie próbek zawierających PQH<sub>2</sub>-9 światłem o wzrastającej intensywności i w obecności fotouczulacza prowadziło do utleniania się tego związku do PQ-9, a następnie do formowania produktów o czasie retencji 4 i 8,4 min. (Rys. 24).

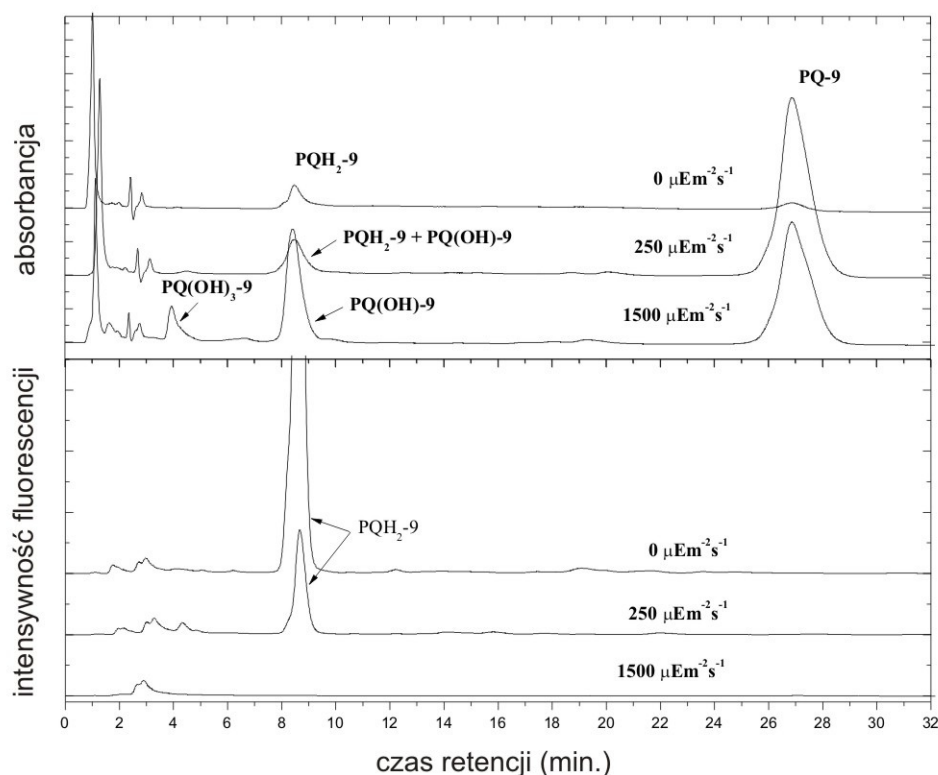
Widma absorpcji obu tych związków były identyczne z widmem absorpcji PQ-9 w heksanie ( $\lambda_{\max}$  = 253,5 nm i 261 nm,  $\lambda_{\min}$  = 227 nm). Związki te były dalej analizowane przy użyciu spektrometrii masowej.



**Rys. 23.** Chromatogramy UQH<sub>2</sub>-10 (100  $\mu\text{M}$ ) w metanolu z użyciem jako fotouczulacza Rb (A) lub TPP (B), po 5 min. naświetlania światłem o różnym natężeniu. Warunki rozdzielania HPLC: kolumna RP C<sub>18</sub>, eluent- metanol/heksan (340/20, v/v); przepływ 1,5 ml/min.; detekcja absorpcyjna przy  $\lambda = 255$  nm; detekcja fluorescencyjna,  $\lambda_{\text{ex}} = 290$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 330$  nm.

### 3. Wyniki

Produkt o czasie retencji 8,4 min., charakteryzował się wartością  $m/z = 803,9$ , co odpowiada jonowi  $[M_{PQ}+O+K]^+$  i może być przypisany związkowi PQ(OH)-9, będącemu monohydroksylową pochodną PQ-9, z grupą OH w łańcuchu bocznym. Natomiast związek o krótszym czasie retencji (4 min.) posiadał  $m/z = 835,8$  odpowiadający jonowi  $[M_{UQ}+3O+K]^+$ , który jest prawdopodobnie związkiem PQ(OH)<sub>3</sub>-9, pochodną PQ-9 zawierającą trzy grupy hydroksylowe w łańcuchach prenylowym.

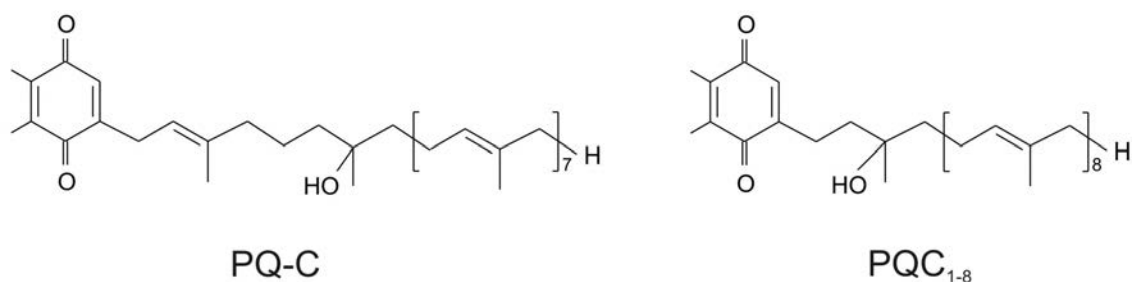


**Rys. 24.** Chromatogramy PQH<sub>2</sub>-9 (100 μM) w metanolu z użyciem Rb jako fotouczulacza, po 5 min. naświetlania światłem o różnym natężeniu. Warunki rozdzielania HPLC: kolumna RP C<sub>18</sub>, eluent- metanol/heksan (340/20, v/v); przepływ 1,5 ml/min.; detekcja absorpcyjna przy  $\lambda = 255$  nm; detekcja fluorescencyjna,  $\lambda_{ex} = 290$  nm,  $\lambda_{em} = 330$  nm.

Pochodne PQ-9 zawierające w łańcuchu bocznym jedną grupę OH, która może być przyłączona do kolejnych reszt izoprenowych, identyfikowane były wcześniej w komórkach roślinnych (Kruk i Strzałka, 1998) i określane jako plastoquinony C (PQ-C) (Rys. 25).



### 3. Wyniki

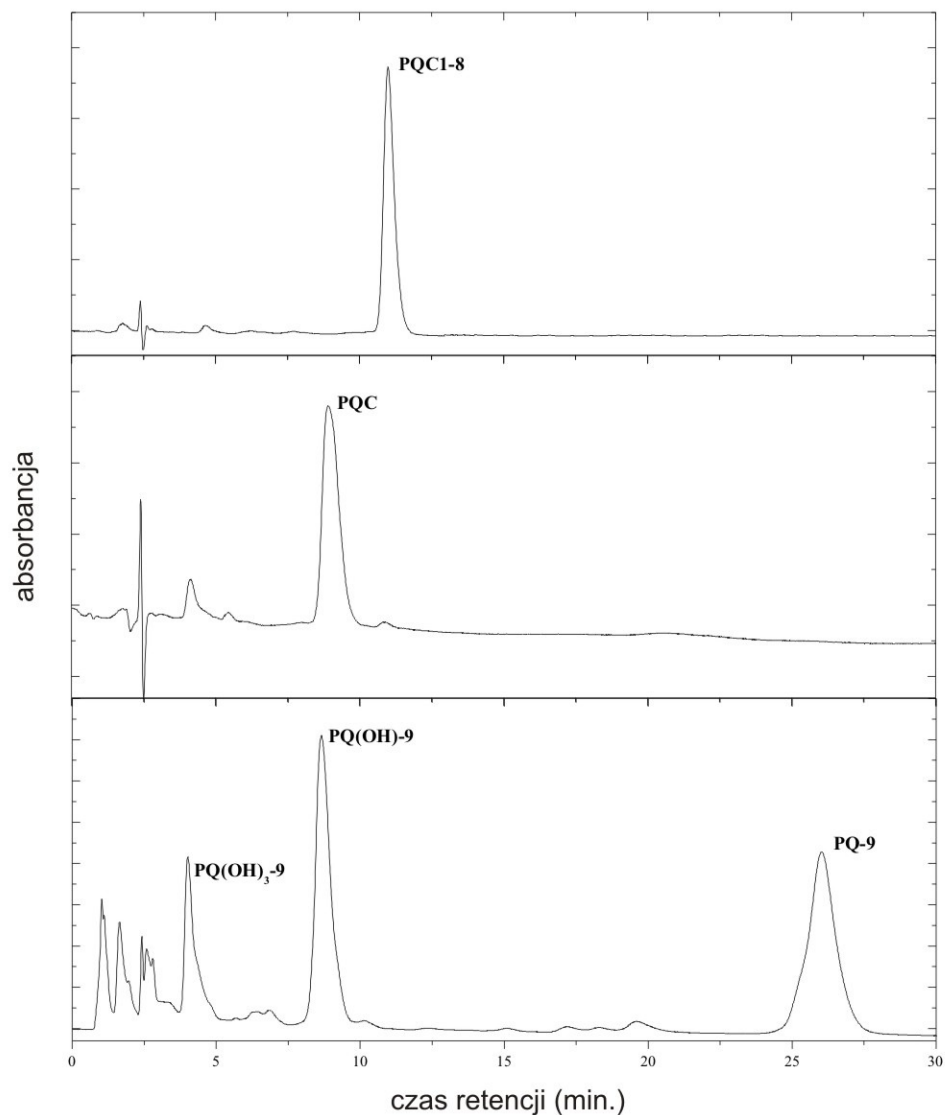


Rys. 25. Wzór strukturalny PQ-C oraz PQC<sub>1-8</sub>.

W celu weryfikacji czy struktura monohydroksylowej pochodnej PQ(OH)-9 otrzymanej w wyniku reakcji PQH<sub>2</sub>-9 z <sup>1</sup>O<sub>2</sub> odpowiada PQ-C, porównywano ruchliwość chromatograficzną PQ(OH)-9 z naturalnie występującym PQ-C oraz PQC<sub>1-8</sub> (Rys. 25), otrzymanym syntetycznie poprzez utlenianie plastochromanolu i zawierającym w cząsteczce trzeciorzędową grupę OH przy pierwszej jednostce izoprenowej. Uzyskane wyniki wykazały, że czasy retencji PQ(OH)-9 i PQ-C są zbliżone, w przeciwieństwie do PQC<sub>1-8</sub>, którego czas retencji był dłuższy (Rys. 26).

Fotosensybilizowane utlenianie  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub> prowadziło do powstawania utlenionej formy tego chinonu, czyli  $\alpha$ -TQ. Tworzenie się  $\alpha$ -TQ jako produktu reakcji  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub> z <sup>1</sup>O<sub>2</sub> obserwowano na chromatogramach HPLC zarówno w przypadku próbek, w których środowisko reakcji stanowił metanol, jak i dla tych przygotowanych w CCl<sub>4</sub>. Dodatkowo identyfikację  $\alpha$ -TQ, jako produktu tej reakcji potwierdzono wykreślając widmo absorpcji dla wyizolowanego związku oraz przeprowadzając analizę uzyskanego preparatu przy użyciu spektrometrii masowej. Stwierdzono także, że  $\alpha$ -TQ nie ulegał dalszemu rozkładowi nawet po zastosowaniu większych, niż w przypadku pozostałych testowanych lipidów prenylowych, intensywności światła oraz dłuższych czasów oświetlania mieszaniny reakcyjnej.

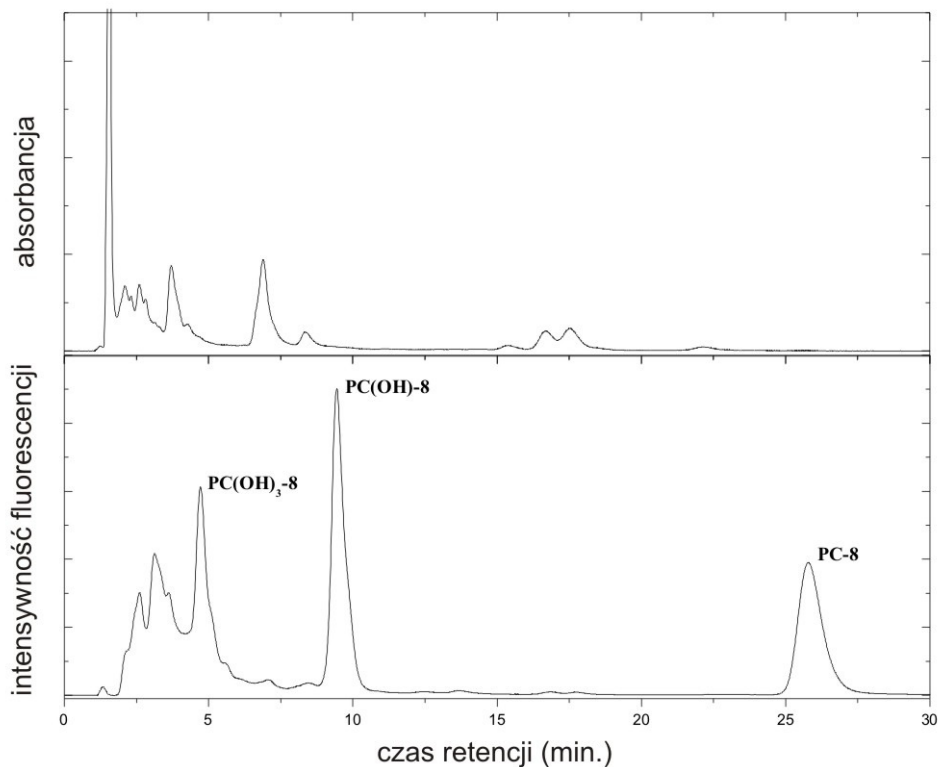
Dane uzyskane dla PC wykazały, że w odróżnieniu od tokoferoli, wśród produktów utleniania PC były także związki fluoryzujące (Rys. 27). Widma absorpcji, wykreślone w heksanie, dla obu tych związków były identyczne z tym charakterystycznym dla PC z  $\lambda_{\text{max}} = 293$  nm i ramieniem przy 299-301 nm.



**Rys. 26.** Chromatogramy PQ-C, PQC<sub>1-8</sub> oraz produktów reakcji PQH<sub>2</sub>-9 z <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Warunki rozdzielania HPLC: kolumna RP C<sub>18</sub>, eluent - metanol/heksan (340:20, v/v), przepływ 1,5 ml/min., detekcja absorpcyjna przy  $\lambda = 255$  nm.

Po wyizolowaniu tych produktów i poddaniu analizie masowej dla produktu o czasie retencji 9,4 min. uzyskano  $m/z = 805,8$  odpowiadający jonowi  $[M_{PC+O+K}]^+$ , który można przypisać związkowi PC(OH), będącym hydroksylową pochodną PC, posiadającym jedną grupę OH w łańcuchu bocznym.

### 3. Wyniki



**Rys. 27.** Chromatogramy PC (100  $\mu\text{M}$ ) w metanolu z użyciem Rb jako fotouczulacza, po 15 min. naświetlania światłem o natężeniu  $1500 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Warunki rozdzielania HPLC: kolumna RP  $\text{C}_{18}$ , eluent - metanol, przepływ 1,5 ml/min.; detekcja absorpcyjna przy  $\lambda = 255 \text{ nm}$ ; detekcja fluorescencyjna:  $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$ .

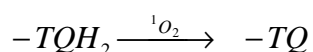
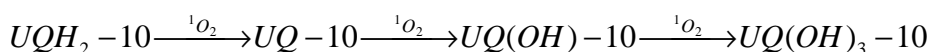
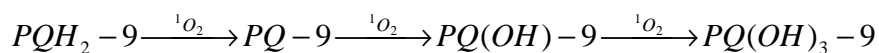
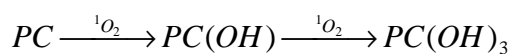
Z kolei dla związku o czasie retencji 4,7 min. widmo masowe ujawniło wartość  $m/z = 837,8$  odpowiadającą jonowi  $[\text{M}_{\text{PC}}+3\text{O}+\text{K}]^+$ , który można identyfikować jako  $\text{PC}(\text{OH})_3$ , hydroksylową pochodną PC z trzema grupami OH w łańcuchu bocznym. Natomiast widma absorpcji związków, których czas retencji wynosił 16,7 i 17,5 min. wykazywały w metanolu maksimum absorpcji przy długości fali 240 nm, a po zakwaszeniu próbki widmo absorpcyjne zmieniało się w to charakterystyczne dla PQ-9. Na tej podstawie produkty te zidentyfikowano jako izomery 8a-wodoronadtlenku-PC. Natomiast produkty o czasie retencji 3,7 oraz 6,9 min. (widoczne na widmie absorpcyjnym) mogą odpowiadać kolejno 8-wodoronadtlenkowi- $\text{PC}(\text{OH})_3$  i 8-wodoronadtlenkowi- $\text{PC}(\text{OH})$ .

Porównując intensywność sygnałów pochodzących z detektorów absorpcyjnego i fluorescencyjnego (Rys. 27) możemy zauważyć, że głównymi produktami utleniania PC są pochodne hydroksylowe, w odróżnieniu od nadtlenków pierścienia chromanolowego, które powstają w tej reakcji niewielkich ilościach.

### 3. Wyniki

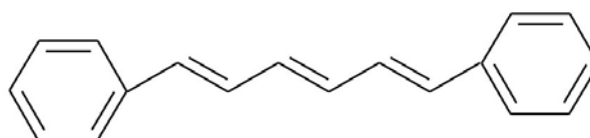
---

Na podstawie otrzymanych wyników zaproponowano następujący schemat powstawania utlenionych pochodnych w reakcji chinoli prenylowych oraz PC z tlenem singletowym:

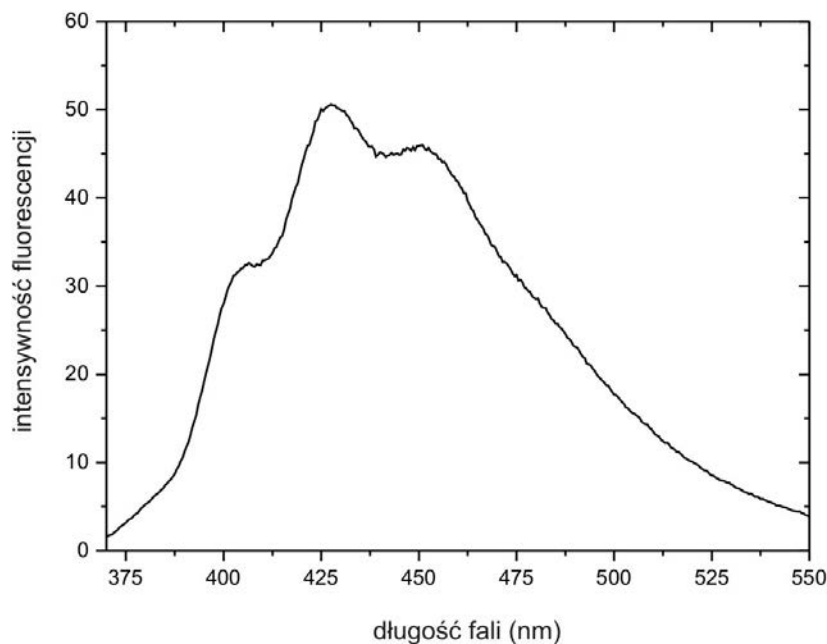


#### 3.5. Detekcja tlenu singletowego z wykorzystaniem 6-difenylo-1,3,5-heksatrienu (DPH)

DPH (Rys. 28), zastosowany w obecnych badaniach, jest węglowodorowym polienem szeroko stosowanym jako sonda fluorescencyjna w badaniach błon modelowych (Lentz, 1989). Jest związkiem stabilnym chemicznie i łatwo wbudowuje się w matrycę błon. Ponadto charakteryzuje się wysoką wydajnością kwantową oraz dobrym odseparowaniem pasma emisji fluorescencji od pasm absorpcyjnych składników błon (Rys. 29).



Rys. 28. Wzór strukturalny 6-difenylo-1,3,5-heksatrienu (DPH).



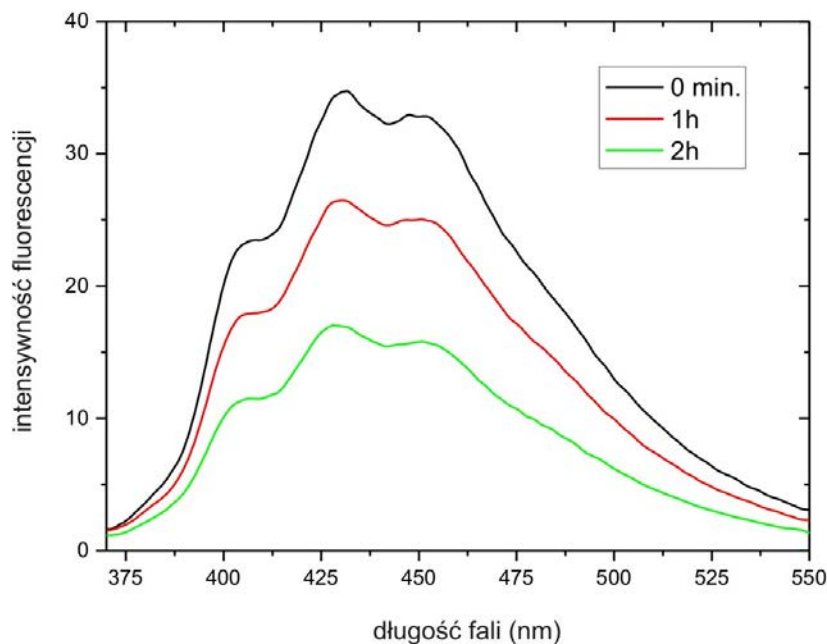
**Rys. 29.** Widmo emisyjne 2 $\mu$ M DPH w tetrahydrofuranie (wzbudzenie przy  $\lambda = 355$  nm, szczeliny: 5 nm i 10 nm; wzbudzenie, emisja).

#### 3.5.1. Detekcja tlenu singletowego w układzie *in vitro*

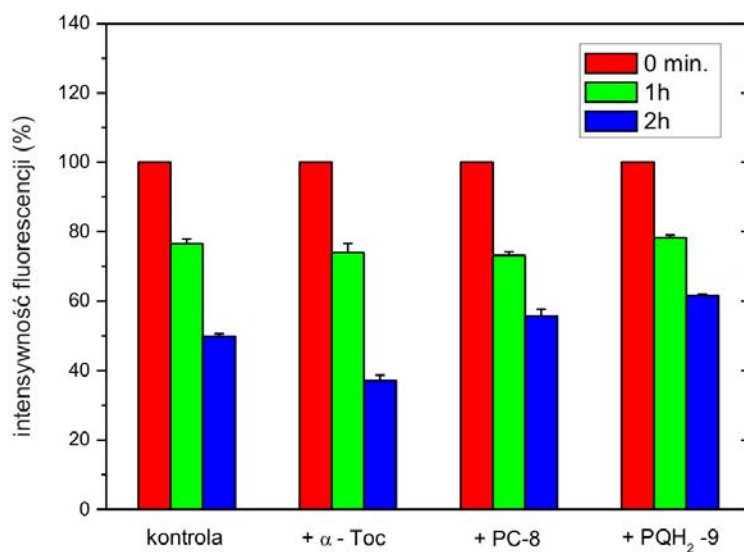
Opracowana metoda detekcji  $^1\text{O}_2$  wykorzystuje fluorescencję DPH, która zanika pod wpływem utleniania wiązań podwójnych przez  $^1\text{O}_2$  w tym związku.

Efekt ten obserwowano zarówno w przypadku próbek zawierających wyłącznie lipidy chloroplastowe (Rys. 30 i 31), jak również tych z dodatkiem lipidów prenylowych ( $\alpha$ -Toc, PC, PQH<sub>2</sub>-9) będących wygaszczaczami  $^1\text{O}_2$  (Rys. 31). W przeprowadzonych badaniach intensywność fluorescencji DPH mierzono po jego wyekstrahowaniu z liposomów. Ekstrakcję prowadzono w tetrahydrofuranie (THF), ponieważ spośród testowanych rozpuszczalników (aceton, DMSO, THF) największą powtarzalność dawała ekstrakcja przy użyciu tego rozpuszczalnika. Zanik fluorescencji DPH dla liposomów z wbudowanymi antyoksydantami po pierwszej godzinie oświetlania był porównywalny z tym, który obserwowano w kontroli. Natomiast po 2h oświetlania, w liposomach zawierających lipidy prenylowe, odnotowano wolniejszy spadek fluorescencji DPH. Wyjątek stanowiły liposomy z dodatkiem  $\alpha$ -tokoferolu, w których poziom DPH był niższy o ponad 30%.

### 3. Wyniki

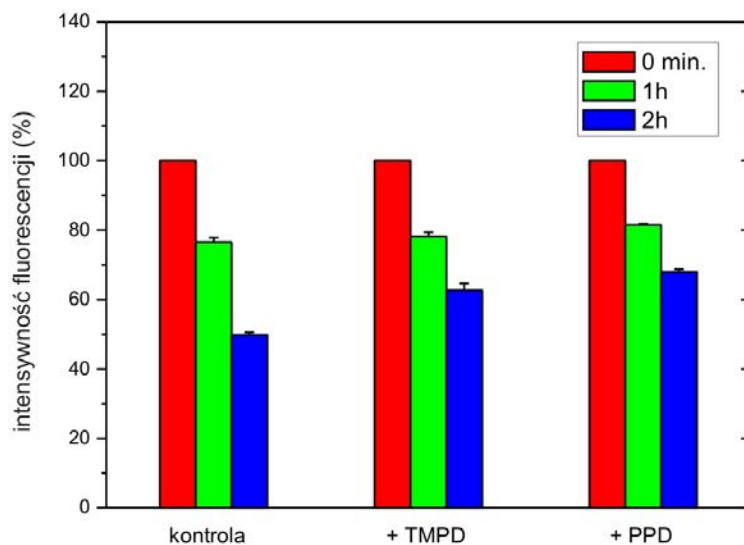


**Rys. 30.** Wpływ  $^1\text{O}_2$  na fluorescencję DPH w ekstrakcie liposomów (lipidy chloroplastowe,  $1\mu\text{M}$  Zn-TPP,  $2\mu\text{M}$  DPH) oświetlanych światłem o intensywności  $100\mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ; warunki pomiaru: wzbudzenie przy  $\lambda = 355\text{ nm}$ , szczeliny:  $5\text{ nm}$  i  $10\text{ nm}$  (wzbudzenie, emisja).



**Rys. 31.** Spadek intensywności fluorescencji DPH w ekstrakcie liposomów bez i z dodatkiem różnych wygaszaczy  $^1\text{O}_2$  (o stężeniu  $25\mu\text{M}$ ) podczas oświetlania liposomów światłem o intensywności  $100\mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ; średnia  $\pm$  SE,  $n = 3$ .

W analogicznym eksperymencie podjęto próbę określenia wydajności DPH w wygaszaniu  $^1\text{O}_2$  przy powierzchni i wewnątrz błony liposomowej. W tym celu badano zanik fluorescencji w liposomach z wbudowanymi aminami o silnych właściwościach gaszenia tlenu singletowego (Bonesi i in., 2006), z których jedna jest dobrze rozpuszczalna w wodzie i innych rozpuszczalnikach polarnych (TMPD), druga zaś w rozpuszczalnikach apolarnych (PPD).



**Rys. 32.** Spadek intensywności fluorescencji DPH w ekstrakcie liposomów bez i z dodatkiem amin (o stężeniu 25  $\mu\text{M}$ ) podczas ich oświetlania liposomów światłem o intensywności  $100 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; średnia  $\pm$  SE,  $n \leq 3$ .

Różnice w rozpuszczalności zastosowanych amin determinowały ich zdolność do penetrowania błony liposomowej (TMPD lokalizowała się przy powierzchni liposomów, PPD w jej wnętrzu), a tym samym ich miejsca wygaszania  $^1\text{O}_2$  i hamowania utleniania DPH. Dla obu amin można zaobserwować hamowanie zaniku intensywności DPH, szczególnie po 2 h reakcji, jednak w przypadku TMPD efekt ten jest silniejszy. Wyniki te wskazują na zdolność DPH do reagowania z  $^1\text{O}_2$  zarówno w hydrofobowym wnętrzu błony jak też, choć w nieco mniejszym stopniu, w sąsiedztwie jej powierzchni (Rys. 32).

#### 3.5.2. Detekcja tlenu singletowego w układzie *in vivo*

Opracowaną metodę wykorzystano następnie do badań *in vivo*. W tym celu, hodowle komórek *Chlamydomonas reinhardtii*, rosnące przez 18h w warunkach słabego światła, poddawano ekspozycji na silne światło przez 2h. W warunkach tych dochodzi do wzmożonej produkcji  $^1\text{O}_2$  w obrębie fotosystemu II (Krieger-Liszkay i in., 2008).

W przeprowadzonych badaniach zmiany zawartości DPH, wbudowanego w błony *Chlamydomonas*, badano w hodowlach rosnących przez 18h w warunkach słabego światła oraz w hodowlach z dodatkiem pirazolanu, inhibitora syntezy tokoferoli i plastochinonu.

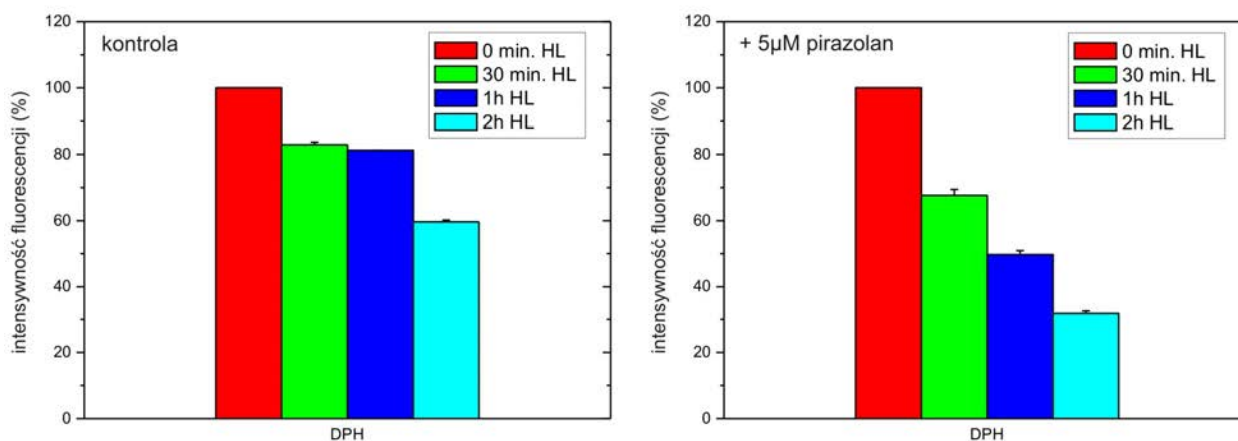
Stopniowy zanik fluorescencji DPH obserwowano zarówno w przypadku hodowli rosnących bez pirazolanu, jak i tych poddanych jego wpływowi (Rys. 33, Tabela 7).

### 3. Wyniki

**Tabela 7.** Wpływ silnego światła i pirazolanu na intensywność fluorescencji DPH w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii*.

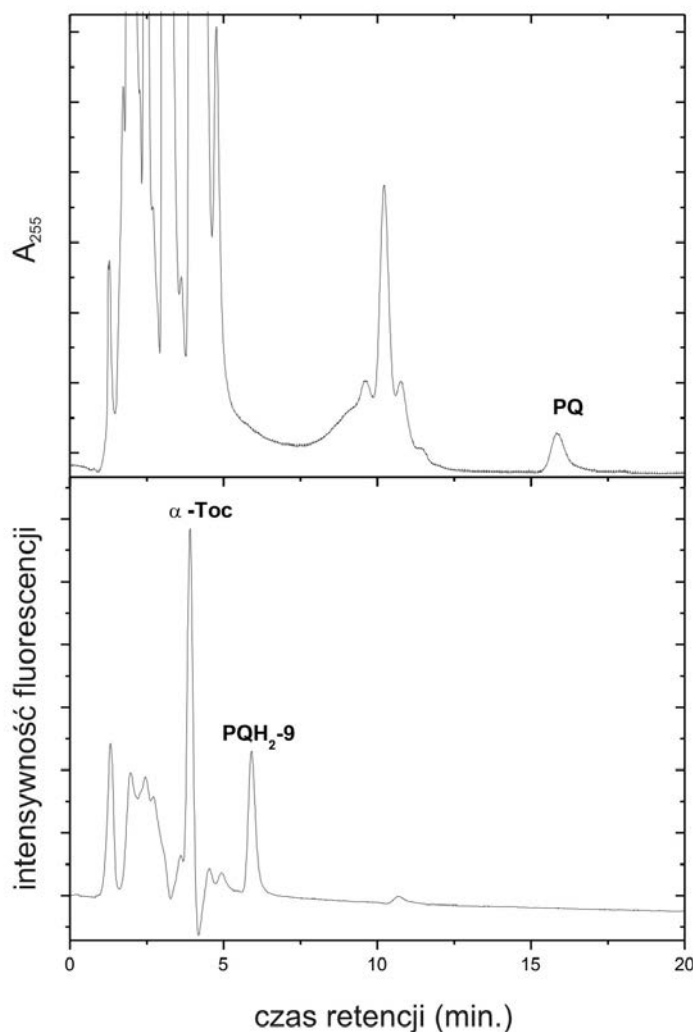
czas ekspozycji hodowli na silne światło	intensywność fluorescencji DPH przy $\lambda = 449$ nm	
	kontrola	5 $\mu$ M pirazolan
0 min.	19,80	12,11
30 min.	16,28	8,41
1h	16,08	5,88
2h	11,91	3,95

W przypadku hodowli z inhibitorem już po 30 min. ekspozycji na silne światło obserwowano spadek intensywności fluorescencji o 30%, po 1h poziom DPH obniżył się dwukrotnie, zaś po 2h odnotowano ponad trzykrotny spadek intensywności fluorescencji tego związku. Natomiast w hodowli kontrolnej po 1h oświetlania poziom DPH obniżył się o 20%, natomiast po 2h odnotowano 40% obniżenie zawartości DPH.



**Rys. 33.** Wpływ silnego światła na zanik fluorescencji DPH w acetonowym ekstrakcie komórek *Chlamydomonas reinhardtii* rosnących bez (po lewej) i w obecności 5  $\mu$ M pirazolanu (po prawej). HL – silne światło, średnia  $\pm$  SE, n = 3.





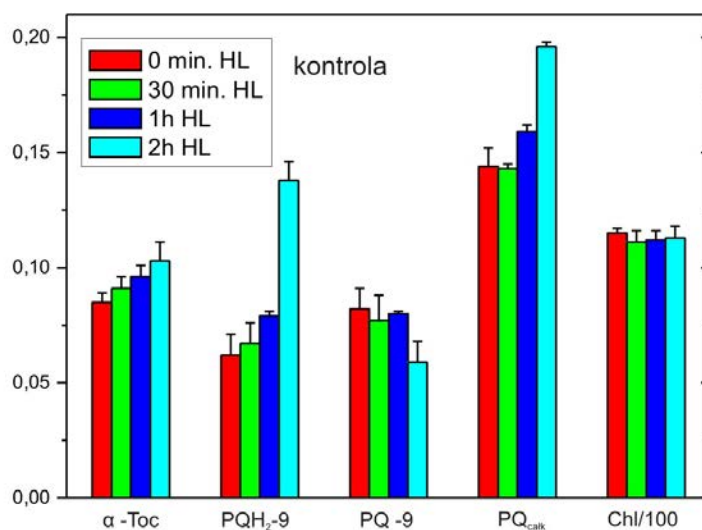
**Rys. 34.** Rozdział HPLC ekstraktu z komórek *Chlamydomonas reinhardtii* rosnących 18h w warunkach słabego światła ( $70 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Warunki rozdziału: kolumna RP  $\text{C}_{18}$ , eluent: metanol/heksan (340/20, v/v); przepływ 1,5 ml/min.; detekcja absorpcyjna przy  $\lambda = 255 \text{ nm}$ ; detekcja fluorescencyjna:  $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$ .

Wykorzystując technikę HPLC analizowano również poziom lipidów prenylowych w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* w czasie stresu świetlnego. W tym celu zastosowano układ umożliwiający jednoczesną detekcję PQ-9 przy użyciu detektora absorpcyjnego oraz  $\alpha$ -Toc i PQH<sub>2</sub>-9 z zastosowaniem detektora fluorescencyjnego (Rys. 34).

Ekspozycji hodowli *Chlamydomonas reinhardtii* na silne światło przez 2h towarzyszył stopniowy wzrost poziomu  $\alpha$ -Toc oraz PQH<sub>2</sub>-9 (Rys. 35). W przypadku PQ-9, jego zawartość utrzymywała się na prawie stałym poziomie przez 1h oświetlania a następnie nieco spadła po 2h stresu świetlnego. Wzrost poziomu plastochinolu może być częściowo wynikiem fotoredukcji PQ-9 do PQH<sub>2</sub>-9, częściowo zaś rezultatem zachodzącej w komórce syntezy *de novo* tego związku, na co może wskazywać wyraźny wzrost całkowitej zawartości plastochinonu

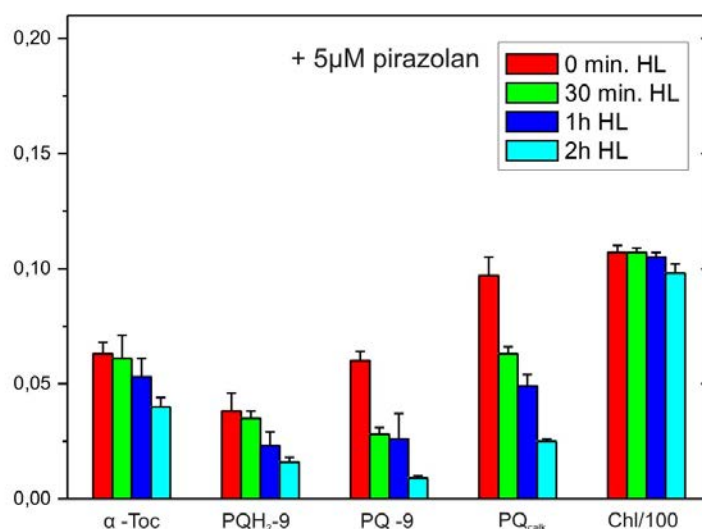
### 3. Wyniki

(utlenionego i zredukowanego) w końcowym etapie doświadczenia (po 2h oświetlania) (Rys. 35).



**Rys. 35.** Wpływ silnego światła na poziom  $\alpha$ -tokoferolu, plastochinonów i chlorofilu w hodowli *Chlamydomonas reinhardtii*. HL – silne światło, Chl – chlorofil, PQ<sub>calc</sub> = PQH<sub>2</sub>-9 + PQ-9, średnia  $\pm$  SE, n =3.

W hodowlach rosnących z dodatkiem inhibitora syntezy lipidów prenylowych podczas ich oświetlania silnym światłem, w przeciwieństwie do hodowli kontrolnej bez dodatku pirazolanu, obserwowano stopniowy spadek zawartości  $\alpha$ -Toc (Rys. 36). Stopniowy spadek zawartości wykazywał także chlorofil. W przypadku PQH<sub>2</sub>-9 i PQ-9 ich wyjściowy poziom w porównaniu do hodowli bez dodatku inhibitora był niższy, zaś po ekspozycji hodowli na silne światło ulegał on wyraźnemu obniżeniu w czasie naświetlania (Rys. 36).



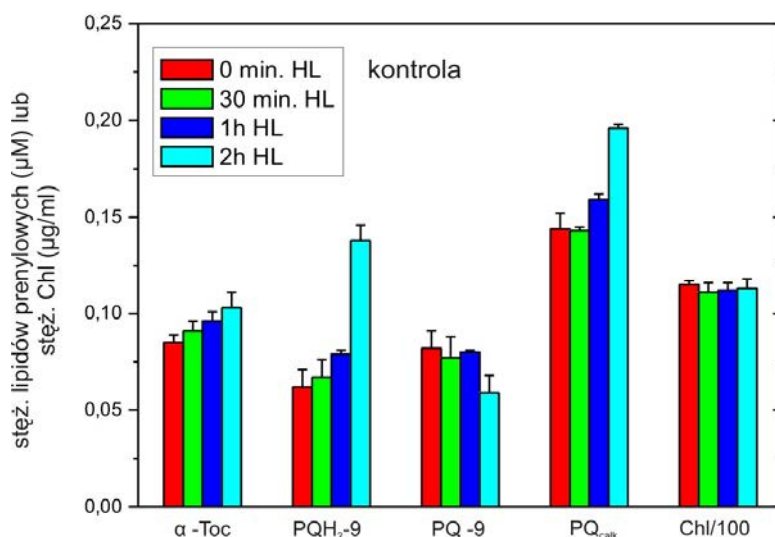
**Rys. 36.** Wpływ silnego światła na poziom  $\alpha$ -tokoferolu, plastochinonów i chlorofilu w hodowli *Chlamydomonas reinhardtii* w obecności 5  $\mu$ M pirazolanu. HL – silne światło, Chl – chlorofil, PQ<sub>calc</sub> = PQH<sub>2</sub>-9 + PQ-9, średnia  $\pm$  SE, n = 3.

### 3. Wyniki

#### 3.6. Analiza zawartości lipidów prenylowych w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* w czasie stresu świetlnego oraz w obecności D<sub>2</sub>O

W celu potwierdzenia udziału <sup>1</sup>O<sub>2</sub> w badanych reakcjach analizowano zawartość lipidów prenylowych w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* poddanych stresowi świetlnemu w obecności D<sub>2</sub>O, w której czas życia <sup>1</sup>O<sub>2</sub> jest znacznie dłuższy.

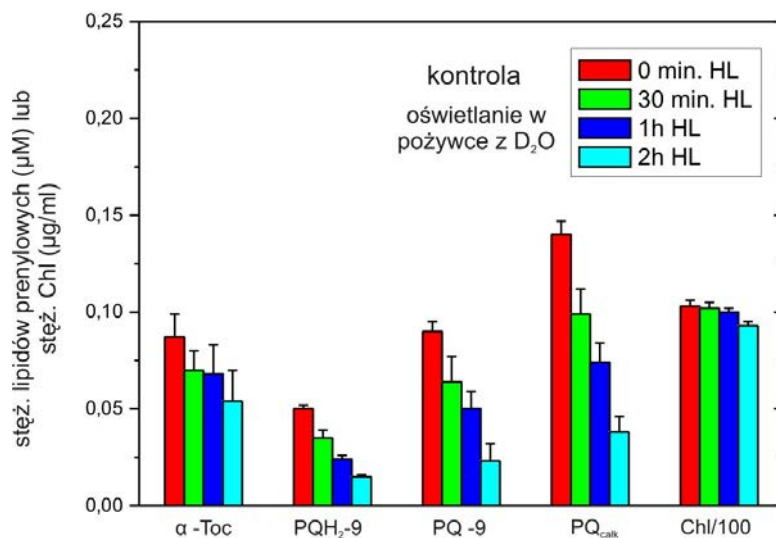
Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że po przeniesieniu komórek glonów do pożywki sporządzonej w ciężkiej wodzie (D<sub>2</sub>O), na czas oddziaływania na nie silnym światłem (2h), skutkowało to stopniowym obniżaniem poziomu α-Toc (Rys.38). Natomiast w hodowli, w której oświetlanie prowadzono w pożywce z wodą destylowaną obserwowano stopniowy wzrost zawartości α-Toc (Rys. 37).



**Rys. 37.** Wpływ silnego światła na poziom α-tokoferolu, plastochinonów i chlorofilu w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii*. HL – silne światło, Chl – chlorofil, PQ<sub>calc</sub> = PQH<sub>2</sub>-9 + PQ-9, średnia ± SE, n = 3.

Podobnie dla PQH<sub>2</sub>-9, po 2h oświetlania komórek silnym światłem, odnotowano ponad dwukrotny wzrost jego zawartości w hodowli kontrolnej (Rys. 37, Tabela 8), w przeciwieństwie do hodowli oświetlanych w D<sub>2</sub>O, gdzie poziom PQH<sub>2</sub>-9 obniżył się 3-krotnie (Rys. 38, Tabela 8). W przypadku PQ-9, po 2h oświetlania komórek silnym światłem, w obu hodowlach stwierdzono spadek poziomu tego związku (Rys. 37, Rys. 38, Tabela 8), przy czym dla hodowli w pożywce z D<sub>2</sub>O był on zdecydowanie bardziej wyraźny. Zawartość chlorofilu uległa nieznacznemu spadkowi w ciężkiej wodzie (Rys. 38).

### 3. Wyniki



**Rys. 38.** Wpływ silnego światła na poziom  $\alpha$ -tokoferolu, plastochinonów i chlorofilu w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* oświetlanych w pożywce z D<sub>2</sub>O. HL – silne światło, Chl – chlorofil, PQ<sub>catk</sub> = PQH<sub>2</sub>-9 + PQ-9, średnia  $\pm$  SE, n = 3.

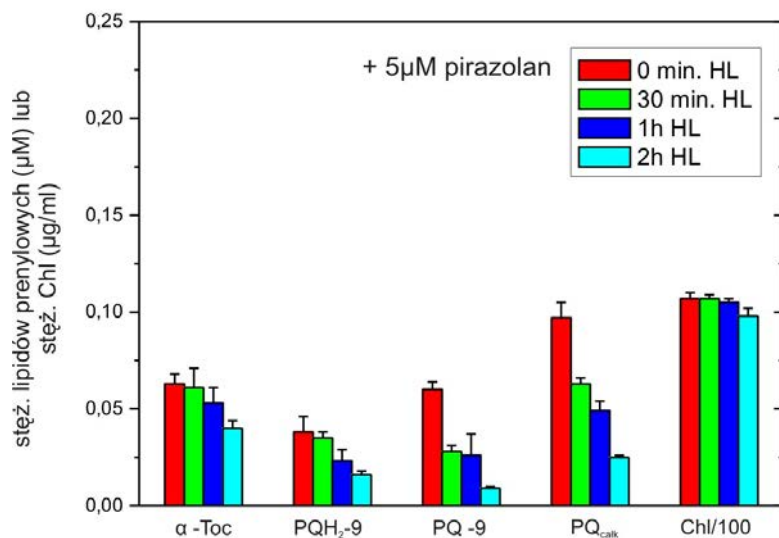
**Tabela 8.** Wpływ silnego światła i ciężkiej wody na zawartość lipidów prenylowych (mol/1000mol Chl) w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii*.

lipid prenylowy	Zawartość lipidów prenylowych (mol/ 1000 mol Chl)			
	kontrola		kontrola oświetlanie w pożywce z D <sub>2</sub> O	
	18 h LL	+ 2 h HL	18 h LL	+ 2 h HL
$\alpha$ -Toc	6,70	8,20	7,62	5,16
PQH <sub>2</sub> -9	4,89	10,98	4,39	1,46
PQ-9	6,44	4,68	7,89	2,18
PQ <sub>catk</sub> .	11,33	15,65	12,28	3,64

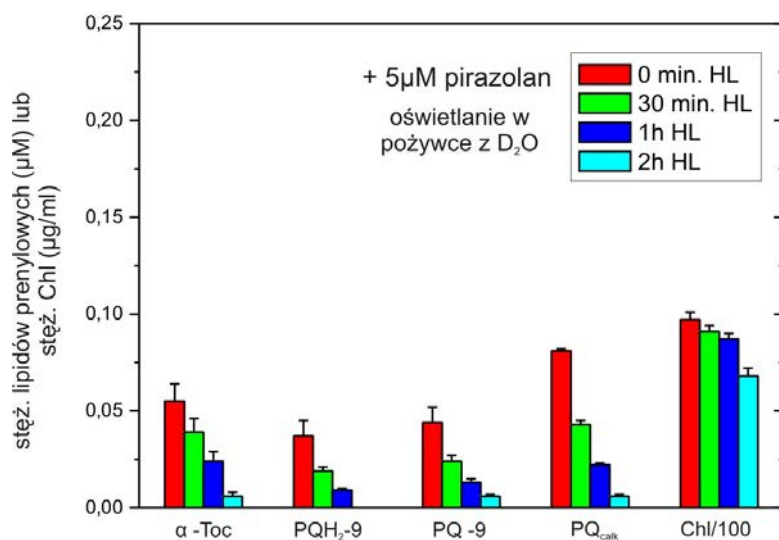
LL – słabe światło ( $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), HL – silne światło ( $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), Chl – chlorofil, PQ<sub>catk</sub> = PQH<sub>2</sub>-9 + PQ-9. SE (n = 3) wynosił  $\leq 10\%$  dla 18h LL oraz  $\leq 30\%$  dla 2h HL podanych wartości.

Równolegle przeprowadzono analogiczne pomiary w hodowlach inkubowanych przez 18h, w warunkach słabego światła z pirazolanem (stęż. końcowe  $5 \mu\text{M}$ ), inhibitorem syntezy lipidów prenylowych.

### 3. Wyniki



**Rys. 39.** Wpływ silnego światła na poziom  $\alpha$ -tokoferolu, plastochinonów i chlorofilu w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* w obecności 5  $\mu$ M pirazolanu. HL – silne światło, Chl – chlorofil, PQ<sub>calk</sub> = PQH<sub>2</sub>-9 + PQ-9, średnia  $\pm$  SE, n = 3.



**Rys. 40.** Wpływ silnego światła na poziom  $\alpha$ -tokoferolu, plastochinonów i chlorofilu w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* w obecności 5  $\mu$ M pirazolanu i oświetlanych w pożywce z D<sub>2</sub>O. HL – silne światło, Chl – chlorofil, PQ<sub>calk</sub> = PQH<sub>2</sub>-9 + PQ-9, średnia  $\pm$  SE, n = 3.

Hodowle te, poddane następnie stresowi świetlnemu, wykazywały spadek zawartości badanych związków zarówno w przypadku hodowli oświetlanych w pożywce z wodą destylowaną (Rys. 39), jak i tych przeniesionych na czas oświetlania do pożywki przygotowanej w D<sub>2</sub>O (Rys. 40). Obserwowane efekty były zdecydowanie większe dla hodowli oświetlanych w obecności D<sub>2</sub>O. Wyjątek stanowił PQ-9, w przypadku którego po 2h oświetlania silnym

### 3. Wyniki

światłem, odnotowano ponad 6-cio krotny jego spadek w hodowli z pożywką z wodą destylowaną i ponad pięciokrotne obniżenie zawartości tego związku w hodowli oświetlanej w pożywce, w której wodę destylowaną zastąpiono D<sub>2</sub>O (Tabela 9). Dla PQH<sub>2</sub>-9 stwierdzono ponad 78-krotnie większy spadek zawartości plastochinolu w hodowli z D<sub>2</sub>O w stosunku do kontroli (Tabela 9). Natomiast w przypadku α-Toc, spadek poziomu tego związku był o 4,4 większy w hodowli oświetlanej w obecności D<sub>2</sub>O w porównaniu z tą inkubowaną w pożywce kontrolnej (Tabela 9). Również w przypadku chlorofili obserwowano różnice w spadku ich zawartości w obu hodowlach (Rys. 39 i 40). Dla hodowli kontrolnej, po 2h stresu świetlnego, obserwowano 8,5 % spadek poziomu chlorofilu, natomiast w obecności D<sub>2</sub>O spadek ten wyniósł 30%.

**Tabela 9.** Wpływ silnego światła, pirazolanu i ciężkiej wody na zawartość lipidów prenylowych (mol/1000mol Chl) w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii*.

lipid prenylowy	Zawartość lipidów prenylowych (mol/ 1000 mol Chl)			
	5 μM pirazolan		5 μM pirazolan oświetlanie w pożywce z D <sub>2</sub> O	
	18 h LL	+ 2 h HL	18 h LL	+ 2 h HL
α-Toc	5,33	3,71	5,17	0,81
PQH <sub>2</sub> -9	3,14	1,46	3,37	0,02
PQ-9	5,01	0,80	4,15	0,79
PQ <sub>całk.</sub>	8,14	2,26	7,52	0,81

LL – słabe światło (70 μmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>), HL – silne światło (1500 μmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>), Chl – chlorofil, PQ<sub>całk.</sub> = PQH<sub>2</sub>-9 + PQ-9. SE (n = 3) wyniósł ≤25% podanych wartości.

W przeprowadzonych badaniach analizowano także udział plastochinonów błonowych i pozabłonowych w obserwowanych reakcjach (Tabela 10 i 11). Pomiarom tym miały na celu określenie czy tlen singletowy, generowany w czasie stresu świetlnego, powoduje utlenianie lipidów prenylowych znajdujących się w błonach fotosyntetycznych (tylakoidach) czy też znajdujących się poza tymi błonami, np. w chloroplastowych plastoglobulach. W komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* hodowanych przez 18h w warunkach słabego światła poziom błonowego PQH<sub>2</sub>-9 był 2,5 wyższy w stosunku do pozabłonowego, oraz 19 razy wyższy dla PQ-9. Natomiast w hodowlach oświetlanych silnym światłem przez 2h zawartość błonowego PQH<sub>2</sub>-9 była 4 razy wyższa niż PQH<sub>2</sub>-9 pozabłonowego, natomiast w przypadku PQ-9 poziom ten był ponad 25 razy wyższy. W hodowlach inkubowanych przez 18h z pirazolanem udział

### 3. Wyniki

plastochinonów błonowych i pozabłonowych był różny od obserwowanego w hodowli kontrolnej. Dla PQH<sub>2</sub>-9 stosunek chinolu błonowego do pozabłonowego wynosił 19, natomiast dla PQ-9 - 40,67. W przypadku hodowli naświetlanych w D<sub>2</sub>O, rozkład lipidów prenylowych po 2 h był tak duży, że trudno było wiarygodnie ocenić powyższe proporcje.

**Tabela 10.** Wpływ silnego światła, pirazolanu i ciężkiej wody na poziom błonowych lipidów prenylowych w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii*.

lipid prenylowy	Zawartość błonowych lipidów prenylowych (µM)			
	kontrola		5 µM pirazolan	
	18 h LL	+ 2 h HL w pożywce z D <sub>2</sub> O	18 h LL	+ 2 h HL w pożywce z D <sub>2</sub> O
α-Toc	0,177	0,083	0,117	0,008
PQH <sub>2</sub> -9	0,036	0,004	0,019	-
PQ-9	0,493	0,178	0,366	0,023
PQ <sub>całk.</sub>	0,529	0,183	0,385	0,023

"-" nie wykryto

**Tabela 11.** Wpływ silnego światła, pirazolanu i ciężkiej wody na poziom pozabłonowych lipidów prenylowych w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii*.

lipid prenylowy	Zawartość pozabłonowych lipidów prenylowych (µM)			
	kontrola		5 µM pirazolan	
	18 h LL	+ 2 h HL w pożywce z D <sub>2</sub> O	18 h LL	+ 2 h HL w pożywce z D <sub>2</sub> O
α-Toc	0,011	-	-	-
PQH <sub>2</sub> -9	0,014	0,001	0,001	-
PQ-9	0,026	0,007	0,009	-
PQ <sub>całk.</sub>	0,040	0,008	0,010	-

"-" nie wykryto

#### 3.7. Badanie udziału anionorodnika ponadtlenkowego w reakcji komórek *Chlamydomonas reinhardtii* na stres świetlny przy zastosowaniu tetranitrometanu (TNM)

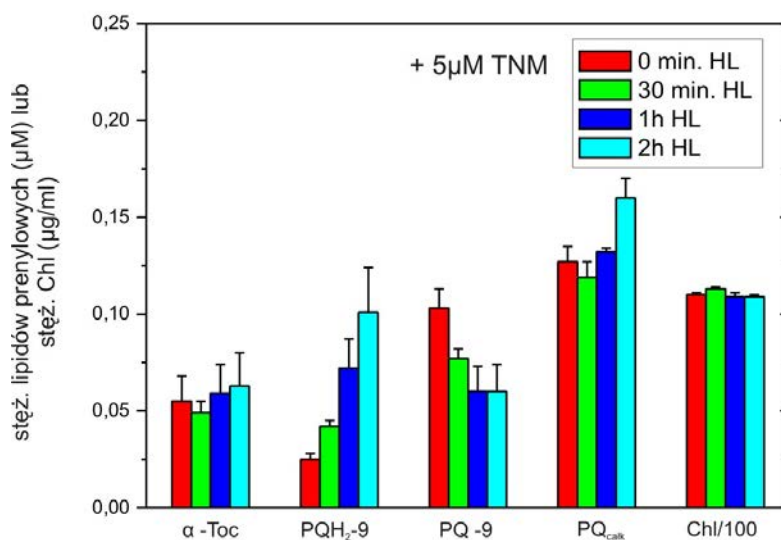
Tetranitrometan (TNM) jest łatwo wbudowującym się w błony, aktywnym wygaszaczem anionorodnika ponadtlenkowego (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Bartosz, 2008). W obecności O<sub>2</sub><sup>•-</sup> TNM ulega redukcji:

### 3. Wyniki



W celu oszacowania udziału  $\text{O}_2^{\bullet}$  w reakcji komórek *Chlamydomonas reinhardtii* na stres świetlny badano poziom lipidów prenylowych i chlorofilu w hodowlach glonów poddanych działaniu 5  $\mu\text{M}$  pirazolanu oraz hodowlach z dodatkiem 5  $\mu\text{M}$  pirazolanu i 5  $\mu\text{M}$  TNM, a także hodowli kontrolnej oświetlanej w obecności 5  $\mu\text{M}$  TNM.

Zmiany zawartości lipidów prenylowych w hodowli kontrolnej były analogiczne do tych obserwowanych w poprzednich doświadczeniach i charakteryzowały się stopniowym spadkiem poziomu  $\alpha$ -Toc i PQ-9 oraz wzrostem zawartości  $\text{PQH}_2$ -9 (Rys. 41). Obserwowano także niewielkie wahania poziomu chlorofilu (Rys. 41).

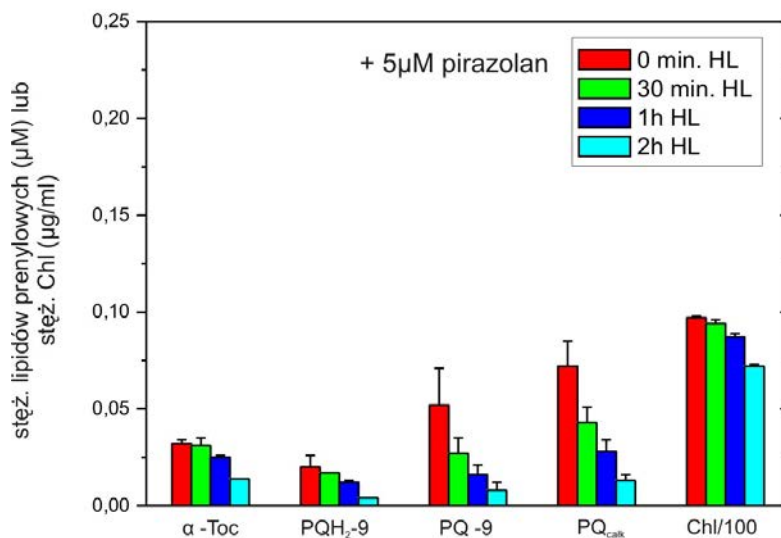


**Rys. 41.** Wpływ silnego światła na poziom  $\alpha$ -tokoferolu, plastochinonów i chlorofilu w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* w obecności 5  $\mu\text{M}$  tetranitrometanu. HL – silne światło, TNM – tetranitrometan, Chl – chlorofil,  $\text{PQ}_{\text{calc}} = \text{PQH}_2$ -9 + PQ-9, średnia  $\pm$  SE, n =3.

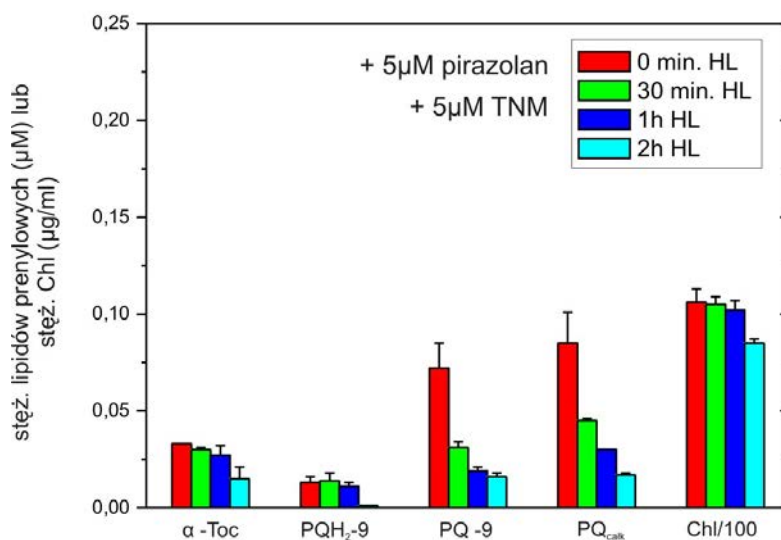
Natomiast w przypadku hodowli z pirazolanem stwierdzono stopniowy spadek zawartości badanych związków w próbkach pochodzących z hodowli bez, jak też z dodatkiem TNM (Rys. 42, Rys. 43, Tabela 12).



### 3. Wyniki



**Rys. 42.** Wpływ silnego światła na poziom  $\alpha$ -tokoferolu, plastochinonów i chlorofilu w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* w obecności 5  $\mu$ M pirazolanu. HL – silne światło, Chl – chlorofil, PQ<sub>calk</sub> = PQH<sub>2</sub>-9 + PQ-9, średnia  $\pm$  SE, n = 3.



**Rys. 43.** Wpływ silnego światła na poziom  $\alpha$ -tokoferolu, plastochinonów i chlorofilu w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* w obecności 5  $\mu$ M pirazolanu i 5  $\mu$ M tetranitrometanu. HL – silne światło, Chl – chlorofil, PQ<sub>calk</sub> = PQH<sub>2</sub>-9 + PQ-9, średnia  $\pm$  SE, n = 3.

W obu badanych układach spadek ten był podobny dla chlorofilu oraz poszczególnych lipidów prenylowych. Wyjątek stanowił PQH<sub>2</sub>-9, który wykazywał 3,5-krotnie niższą zawartość w hodowlach z dodatkiem TNM, po 2h oświetlania silnym światłem, w stosunku do tych inkubowanych wyłącznie z pirazolanem (Tabela 12).

### 3. Wyniki

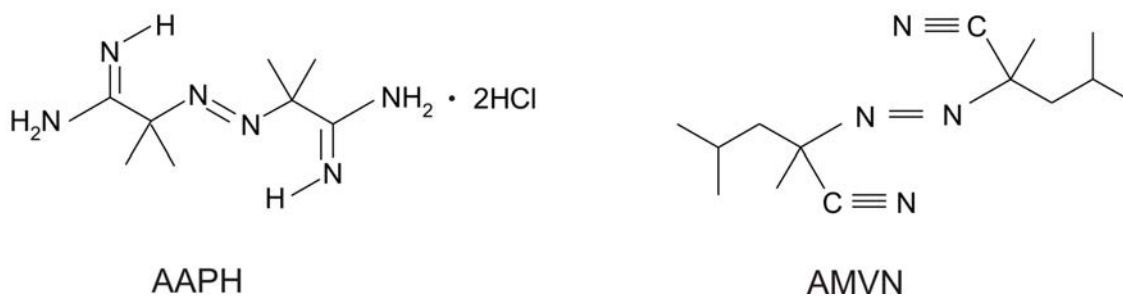
**Tabela 12.** Wpływ silnego światła, pirazolanu i tetranitrometanu na zawartość lipidów prenylowych (mol/1000mol Chl) w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii*.

lipid prenylowy	Zawartość lipidów prenylowych (mol/ 1000 mol Chl)					
	kontrola + 5 $\mu$ M TNM		5 $\mu$ M pirazolan		5 $\mu$ M pirazolan + 5 $\mu$ M TNM	
	18 h LL	+ 2 h HL	18 h LL	+ 2 h HL	18 h LL	+ 2 h HL
$\alpha$ -Toc	4,48	5,19	3,01	1,75	2,84	1,60
PQH <sub>2</sub> -9	2,00	8,33	1,85	0,54	1,11	0,09
PQ-9	8,36	4,90	4,84	1,05	6,05	1,73
PQ <sub>całk.</sub>	10,36	13,23	6,69	1,59	7,16	1,82

LL – słabe światło ( $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), HL – silne światło ( $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), TNM- tetranitrometan, Chl – chlorofil, PQ<sub>całk.</sub> = PQH<sub>2</sub>-9 + PQ-9. SE (n = 3) wynosił  $\leq 30\%$  dla 18h LL oraz  $\leq 25\%$  dla 2h HL podanych wartości.

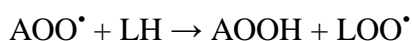
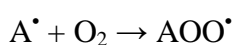
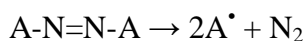
### 3.8. Badanie zdolności hamowania procesu peroksydacji lipidów przez lipidy prenylowe

Reakcję peroksydacji lipidów generowano przy użyciu azoinicjatorów AAPH i AMVN (Rys. 44).



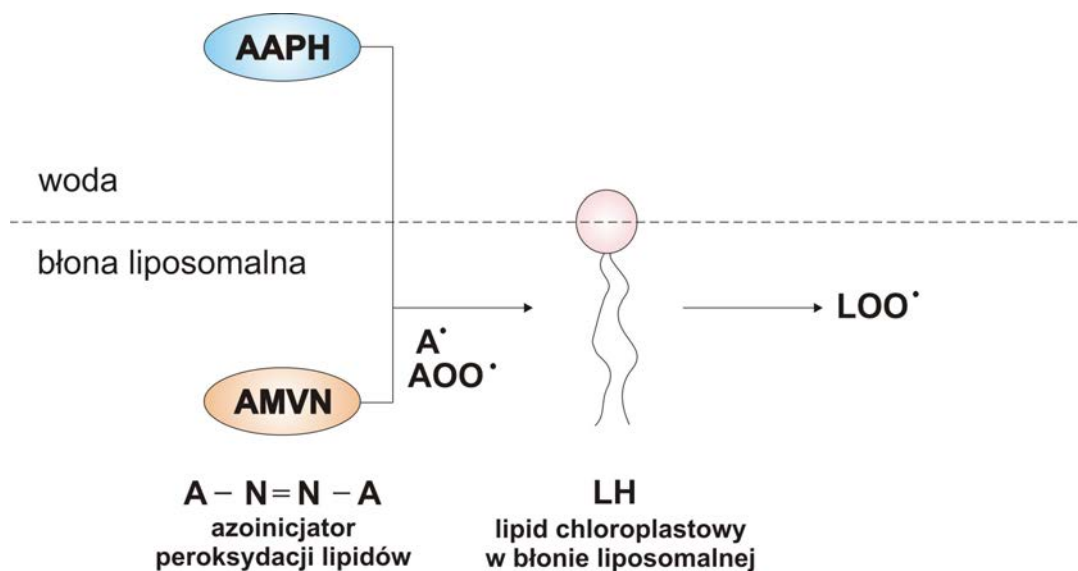
**Rys. 44.** Wzory strukturalne azoinicjatorów.

Termiczna homoliza tych związków prowadzi do powstawania rodników alkilowych (A $\cdot$ ), które w reakcji z tlenem tworzą rodniki nadtlenkowe (AOO $\cdot$ ):



### 3. Wyniki

W przeprowadzonych badaniach generację peroksydacji lipidów prowadzono na zewnątrz błony liposomów z wykorzystaniem AAPH oraz wewnątrz błon liposomowych przy użyciu AMVN (Rys. 45).



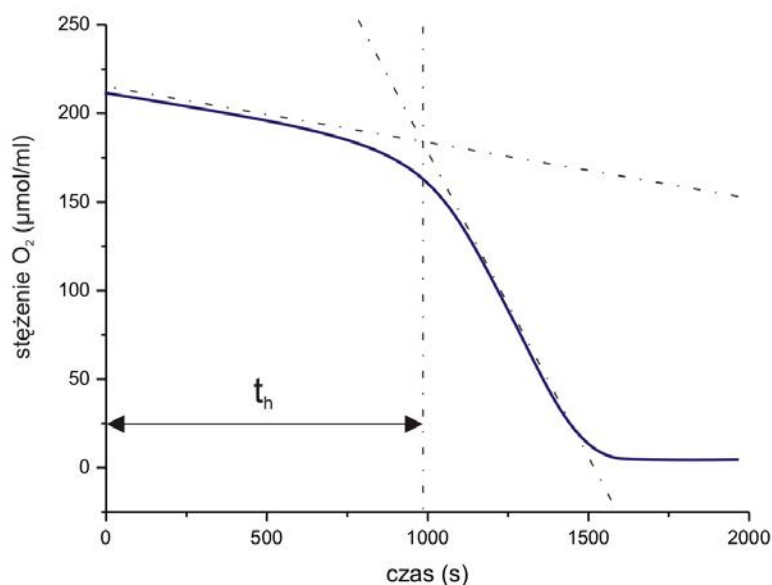
**Rys. 45.** Schemat generacji peroksydacji lipidów w błonie liposomalnej przy użyciu AAPH i AMVN ( $A^{\bullet}$  - rodnik alkilowy,  $AOO^{\bullet}$  - rodnik nadtlenkowy,  $LOO^{\bullet}$  - rodnik nadtenkowy lipidu).

#### 3.8.1. Inicjacja reakcji peroksydacji przy użyciu AAPH

Efektywność hamowania reakcji peroksydacji lipidów przez lipidy prenylowe ( $\alpha$ -Toc,  $\gamma$ -Toc, PC, PQH<sub>2</sub>-9, UQH<sub>2</sub>-10 oraz  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub>), generowanej przy zastosowaniu AAPH, badano przy użyciu elektrody tlenowej Clarka, mierząc szybkość konsumpcji tlenu w układzie.

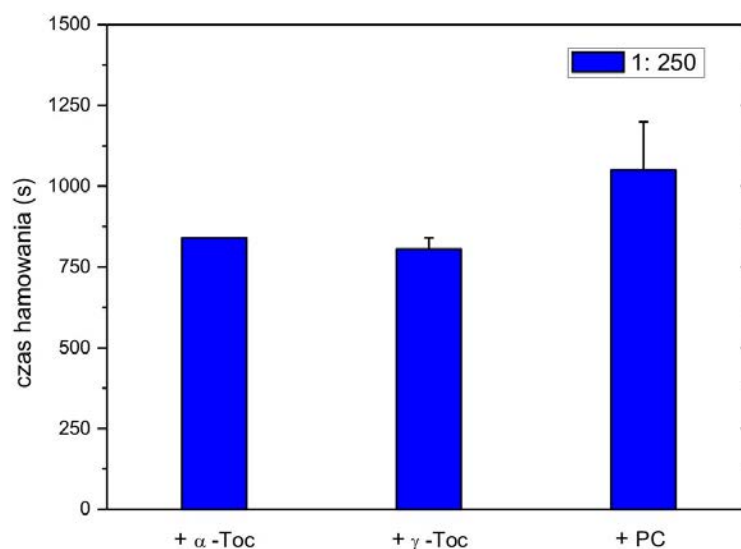
W celu porównania wydajności hamowania tej reakcji przez badane lipidy prenylowe dla poszczególnych pomiarów (z wyjątkiem tych próbek, w których obserwowano 100% zahamowanie reakcji peroksydacji) wyznaczano szybkość hamowania reakcji peroksydacji. Rys. 46 przedstawia sposób wyznaczania czasu hamowania ( $t_h$ ) reakcji peroksydacji przez analizowane zawiązki:

### 3. Wyniki



**Rys. 46.** Schemat obrazujący sposób wyznaczania czasu hamowania =  $t_h$  reakcji peroksydacji lipidów w liposomach.

Uzyskane wyniki wskazują, że badane chromanole, już przy stężeniach  $2 \mu\text{M}$ , wydajnie hamowały reakcję peroksydacji generowaną przy użyciu AAPH (Rys. 47 i 48). Zastosowanie wyższych stężeń ( $10$  i  $50 \mu\text{M}$ ) skutkowało 100% zahamowaniem peroksydacji lipidów.

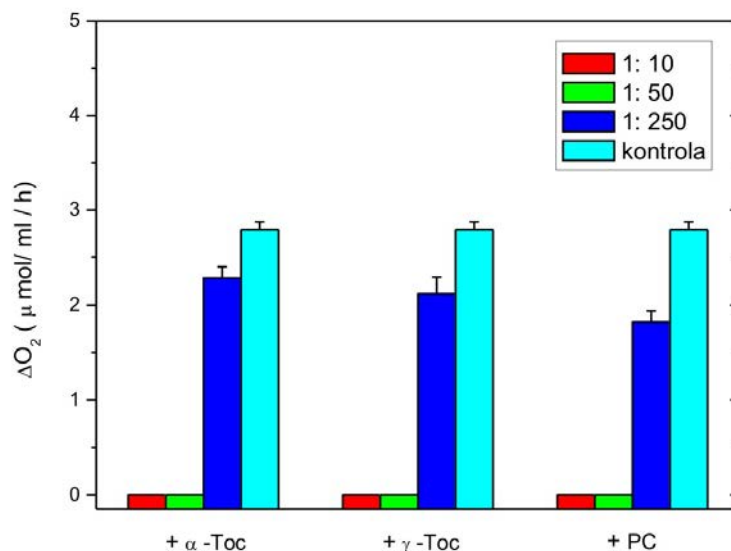


**Rys. 47.** Efektywność hamowania reakcji peroksydacji przez badane chromanole, średnia  $\pm$  SE,  $n = 3$ .

Wśród badanych chromanoli najwyższą efektywnością charakteryzował się PC. Czas hamowania reakcji peroksydacji przez ten związek, przy stężeniu początkowym  $2 \mu\text{M}$ , był dłuższy o 20% w porównaniu do  $\alpha$ -Toc i 23% w stosunku do  $\gamma$ -Toc (Rys. 47).

### 3. Wyniki

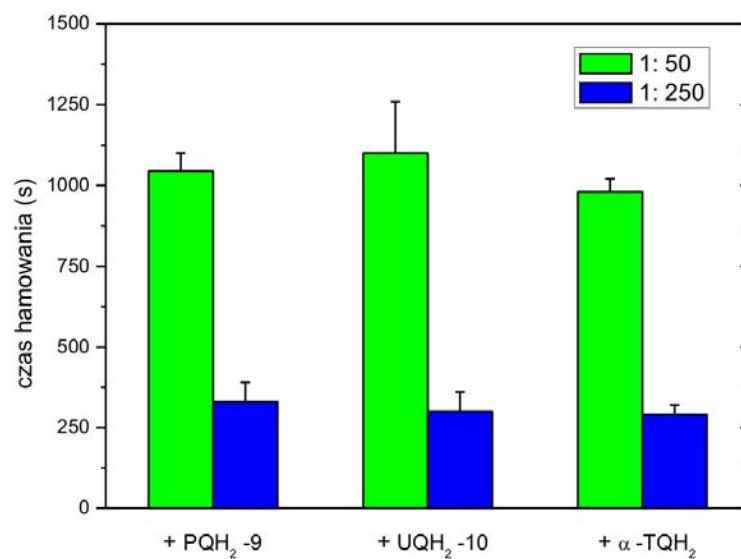
Analiza szybkości konsumpcji  $O_2$  w badanym układzie (faza szybkiej konsumpcji tlenu w czasie  $> t_h$ , Rys. 46) wykazała, że w obecności  $2 \mu M$  PC w liposomach zużycie  $O_2$  było niższe o 35% w porównaniu do kontroli (Rys. 48). Nieco szybciej zachodziła konsumpcja  $O_2$  w liposomach z  $\gamma$ -Toc (24% w stosunku do kontroli). Peroksydacja lipidów w tych warunkach najslabiej hamowana była przez  $\alpha$ -Toc.



**Rys. 48.** Wpływ tokochochromanoli o różnych stężeniach na szybkość konsumpcji  $O_2$  w liposomach, średnia  $\pm$  SE,  $n = 3$ .

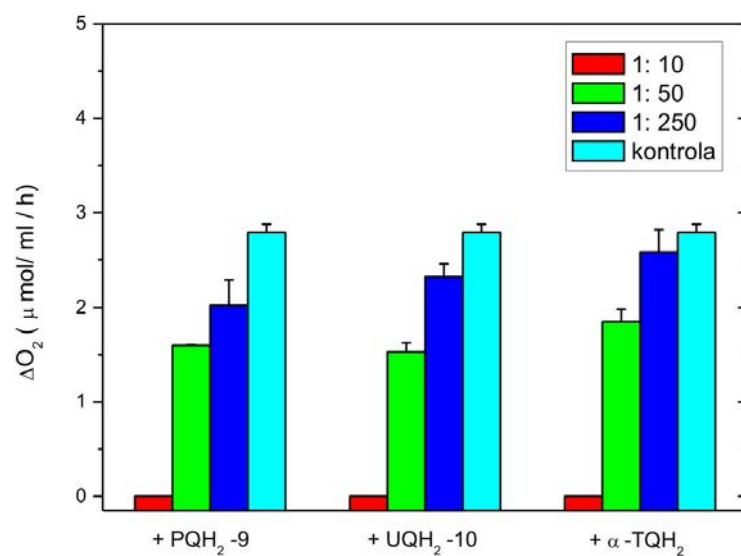
Z kolei chinole testowane w układzie z AAPH charakteryzowały się mniejszą w porównaniu do chromanoli efektywnością w hamowaniu peroksydacji lipidów. Całkowite hamowanie tego procesu obserwowano jedynie w przypadku liposomów z chinolami wbudowanymi w proporcji 1:10 (lipid prenylowy:lipid chloroplastowy). Zastosowanie niższych stężeń (10 i  $2 \mu M$ , tj. proporcji odpowiednio 1:50 i 1:250) skutkowało częściowym hamowaniem peroksydacji przez testowane chinole (Rys. 49 i 50). Wśród badanych zredukowanych chinonów reakcja peroksydacji najskuteczniej hamowana była przez  $PQH_2-9$  o stężeniu początkowym w liposomach  $2 \mu M$ , nieco dłuższe czasy hamowania wykazywały  $UQH_2-10$  i  $\alpha$ - $TQH_2$  (Rys. 49). W przypadku liposomów, do których wbudowano chinole o stężeniu  $10 \mu M$ , reakcję peroksydacji wydajniej hamował  $UQH_2-10$ , natomiast nieco słabsze działanie w tym kierunku prezentował  $PQH_2-9$  i  $\alpha$ - $TQH_2$  (Rys. 49).

### 3. Wyniki



**Rysunek. 49.** Efektywność hamowania reakcji peroksydacji przez badane chinole, średnia  $\pm$  SE, n = 3.

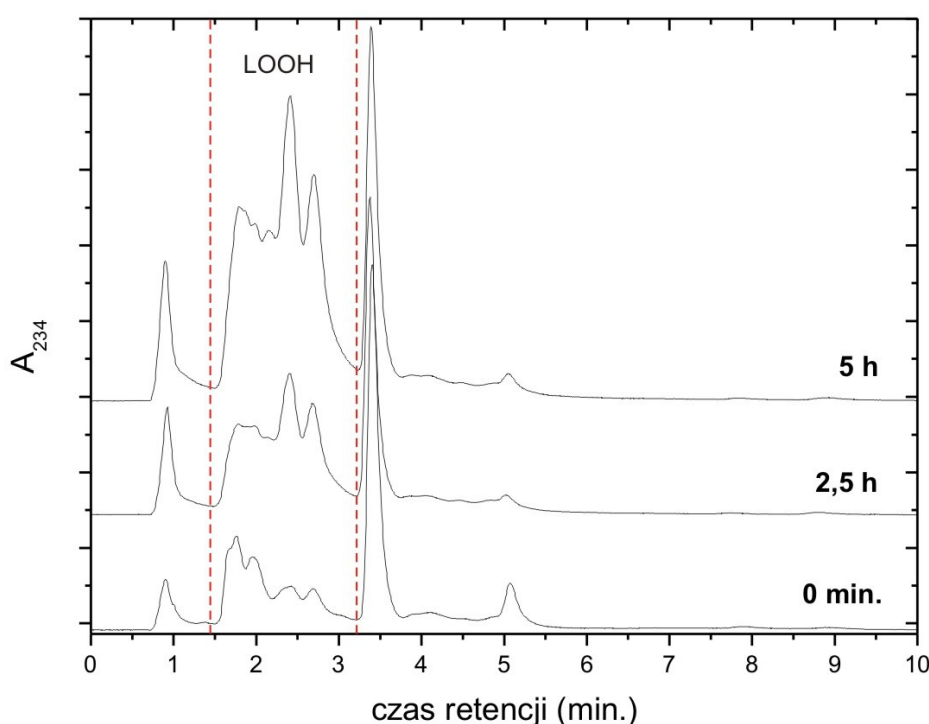
Hamowanie konsumpcji O<sub>2</sub> w zastosowanym układzie było najwydajniejsze w przypadku α-TQH<sub>2</sub>, nieco słabsze dla UQH<sub>2</sub>-10 oraz najmniej wydajne dla PQH<sub>2</sub>-9 (Rys. 50).



**Rysunek. 50.** Wpływ chinoli prenylowych o różnych stężeniach na szybkość konsumpcji O<sub>2</sub> w liposomach, średnia  $\pm$  SE, n = 3.

## 3.8.2. Inicjacja reakcji peroksydacji przy użyciu AMVN

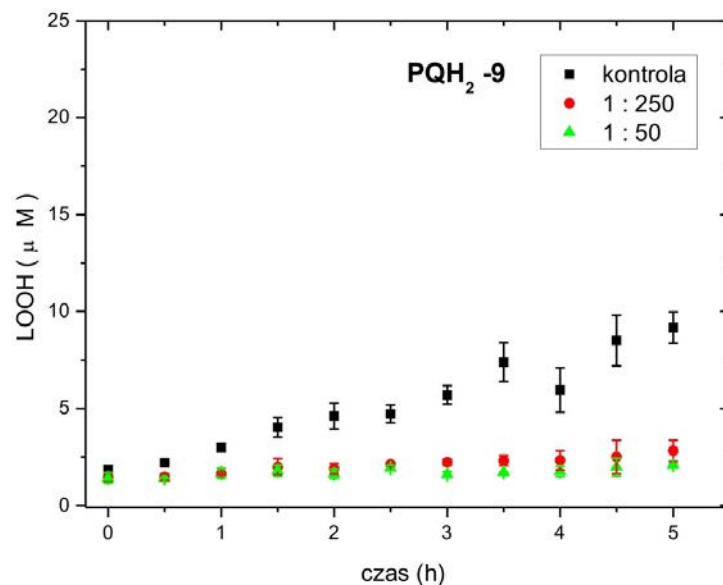
Analizę wydajności hamowania peroksydacji lipidów przez badane lipidy prenylowe w układzie z AMVN przeprowadzono w oparciu o pomiary HPLC poziomu nadtlenków kwasów tłuszczowych (LOOH), powstających w wyniku tej reakcji. Przykładowe rozdziały HPLC ekstraktu mieszaniny reakcyjnej pobieranej w różnych punktach czasowych doświadczenia przedstawiono na Rys. 51. Zawartość nadtlenków kwasów tłuszczowych wyznaczono na podstawie powierzchni pików o czasie retencji 1,5 – 3,2 min. i molowego współczynnika absorpcji LOOH przy  $\lambda = 234$  nm wynoszącym  $25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Aikens i Dix 1993).



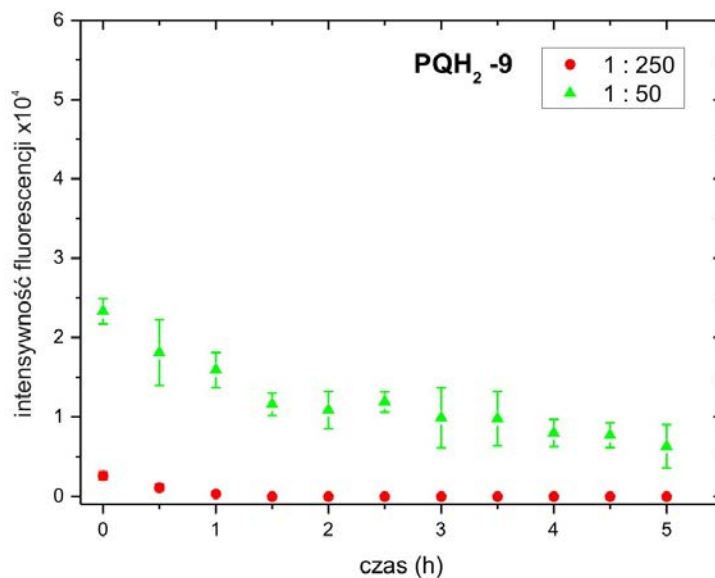
**Rys. 51.** Chromatogramy ekstraktów liposomów złożonych z lipidów chloroplastowych po różnym czasie od zainicjowania reakcji przez  $100 \mu\text{M}$  AMVN, warunki rozdziału HPLC: kolumna RP  $\text{C}_{18}$ , eluent: acetonitryl/metanol/woda (72/8/1, v/v/v), przepływ  $1,5 \text{ ml/min.}$ , detekcja absorpcyjna przy  $\lambda = 234 \text{ nm}$ , detekcja fluorescencyjna  $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$ . LOOH – nadtlenek kwasu tłuszczowego.

Otrzymane wyniki wykazały, że wśród badanych lipidów prenylowych reakcję peroksydacji lipidów w liposomach, w obu zastosowanych stężeniach, najefektywniej hamował PQH<sub>2</sub>-9 (Rys. 52 i 60), czemu towarzyszył także stopniowy spadek zawartości tego związku w czasie trwania reakcji (Rys. 53).

### 3. Wyniki



**Rys. 52.** Stężenie nadtlenków kwasów tłuszczowych (LOOH) w liposomach złożonych z lipidów chloroplastowych, bez oraz w obecności plastochinolu, w czasie reakcji peroksydacji inicjowanej przez 100  $\mu\text{M}$  AMVN, średnia  $\pm$  SE,  $n \leq 3$ .

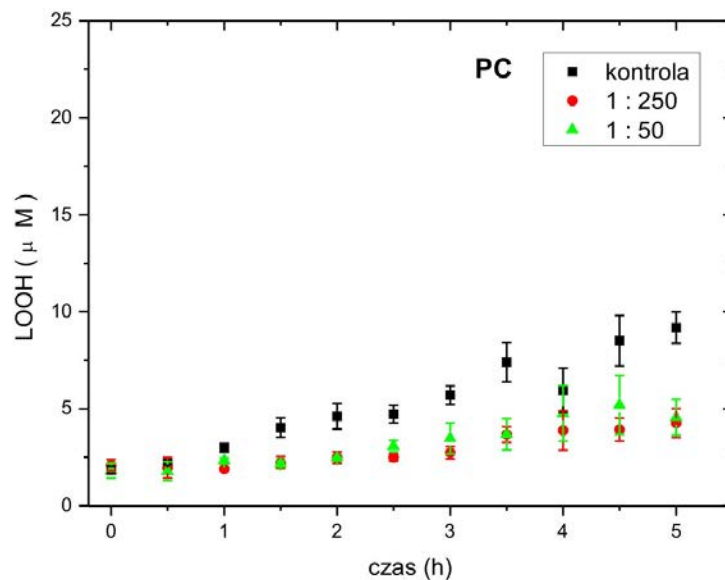


**Rys. 53.** Zmiany zawartości plastochinolu (stężenie początkowe 2 i 10  $\mu\text{M}$ ) w liposomach złożonych z lipidów chloroplastowych w czasie reakcji peroksydacji inicjowanej przez 100  $\mu\text{M}$  AMVN średnia  $\pm$  SE,  $n \leq 3$ .

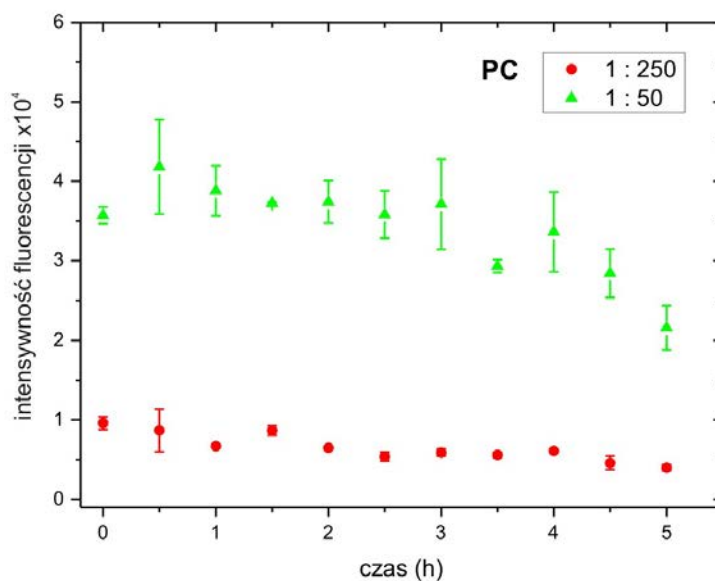
Wyraźne hamowanie procesu peroksydacji wykazywał także PC, które był nieco słabsze przy jego wyższych stężeniach (Rys. 54 i 60). W obu przypadkach stopniowe utlenianie PC powodowało wzmożoną peroksydację łańcuchów lipidowych (Rys. 54, 55, 60).



### 3. Wyniki



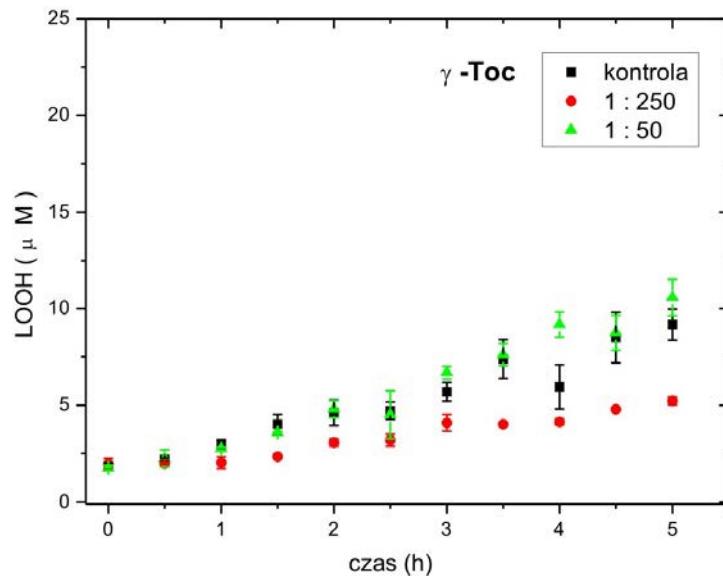
**Rys. 54.** Stężenie nadtlenków kwasów tłuszczowych (LOOH) w liposomach złożonych z lipidów chloroplastowych, bez oraz w obecności plastochromanolu, w czasie reakcji peroksydacji inicjowanej przez 100  $\mu\text{M}$  AMVN, średnia  $\pm$  SE,  $n \leq 3$ .



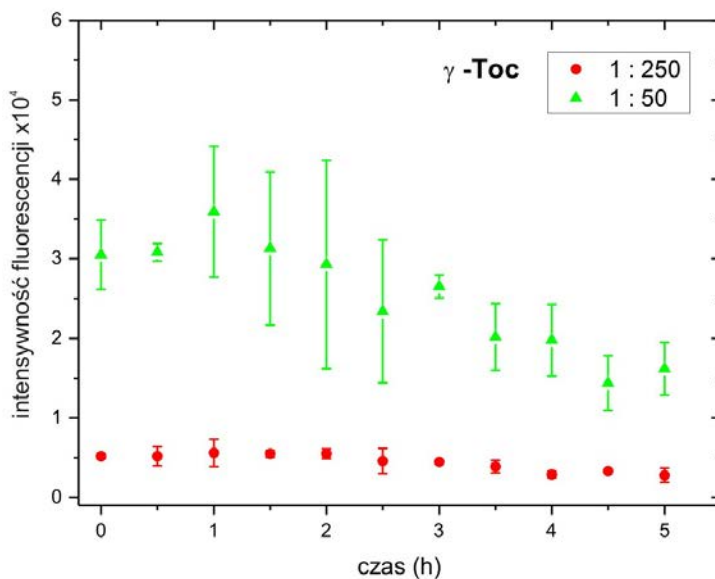
**Rys. 55.** Zmiany zawartości plastochromanolu (stężenie początkowe 2 i 10  $\mu\text{M}$ ) w liposomach złożonych z lipidów chloroplastowych w czasie reakcji peroksydacji inicjowanej 100  $\mu\text{M}$  AMVN, średnia  $\pm$  SE,  $n \leq 3$ .

Zdecydowanie słabszym działaniem przeciwutleniającym, w porównaniu do PQH<sub>2</sub>-9 i PC, charakteryzował się  $\gamma$ -Toc. Związek ten efektywnie hamował peroksydację lipidów w liposomach, w których zastosowano niższe stężenie tego związku (2  $\mu\text{M}$ ) (Rys. 56, 57, 60.).

### 3. Wyniki



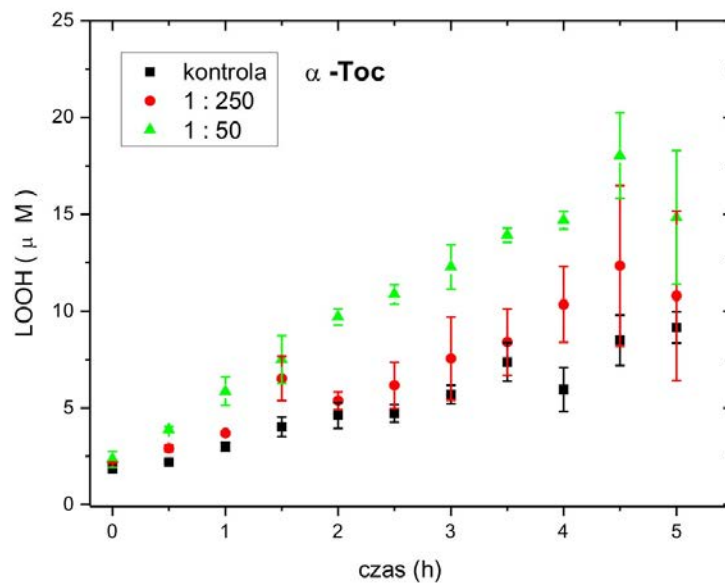
**Rys. 56.** Stężenie nadtlenków kwasów tłuszczowych (LOOH) w liposomach złożonych z lipidów chloroplastowych, bez oraz w obecności  $\gamma$ -tokoferolu, w czasie reakcji peroksydacji inicjowanej przez 100  $\mu$ M AMVN, średnia  $\pm$  SE,  $n \leq 3$ .



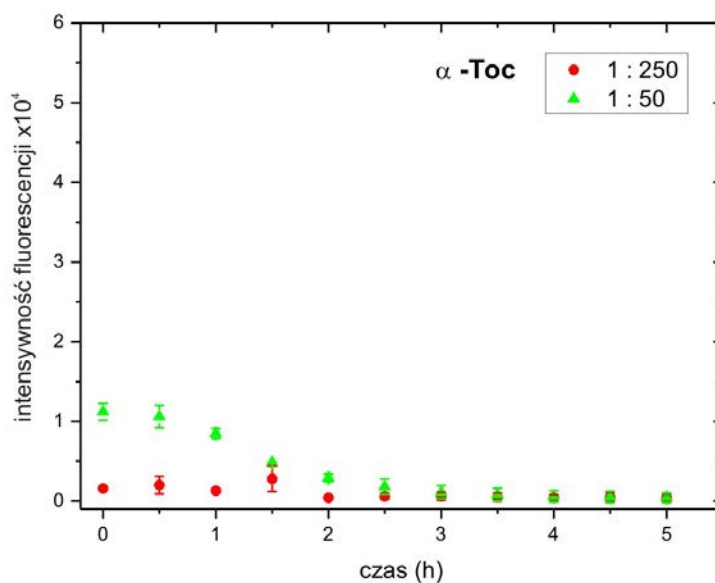
**Rys. 57.** Zmiany zawartości  $\gamma$ -tokoferolu (stężenie początkowe 2 i 10  $\mu$ M) w liposomach złożonych z lipidów chloroplastowych w czasie reakcji peroksydacji inicjowanej przez 100  $\mu$ M AMVN, średnia  $\pm$  SE,  $n \leq 3$ .

$\alpha$ -Toc zastosowany w układzie liposomowym nie wykazywał efektu w hamującego reakcji peroksydacji lipidów chloroplastowych, co więcej nawet stymulował tą reakcję (Rys. 58 i 60.). Podobnie jak w przypadku innych lipidów prenylowych, poziom  $\alpha$ -Toc stopniowo malał w czasie badanej reakcji (Rys. 59).

### 3. Wyniki



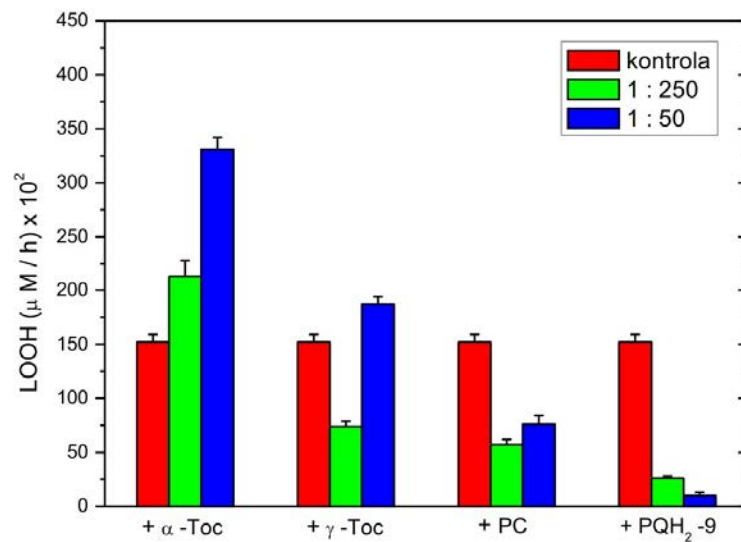
**Rys. 58.** Stężenie nadtlenków kwasów tłuszczowych (LOOH) w liposomach złożonych z lipidów chloroplastowych, bez oraz w obecności  $\alpha$ -tokoferolu, w czasie reakcji peroksydacji inicjowanej przez  $100\ \mu\text{M}$  AMVN, średnia  $\pm$  SE,  $n \leq 3$ .



**Rys. 59.** Zmiany zawartości  $\alpha$ -tokoferolu (stężenie początkowe 2 i  $10\ \mu\text{M}$ ) w liposomach złożonych z lipidów chloroplastowych w czasie reakcji peroksydacji inicjowanej przez  $100\ \mu\text{M}$  AMVN, średnia  $\pm$  SE,  $n \leq 3$ .

### 3. Wyniki

---



**Rys. 60.** Wpływ lipidów prenylowych na szybkość tworzenia nadtlenków w liposomach złożonych z lipidów chloroplastowych w czasie reakcji peroksydacji inicjowanej przez 100  $\mu\text{M}$  AMVN, średnia  $\pm$  SE,  $n \leq 3$ .

### 4. Dyskusja

Badania nad RFT i komórkowymi systemami obronnymi przed ich szkodliwym działaniem są intensywnie prowadzone od wielu lat. Wskazują one, że poza tokochromanolami (Toc, Tt), znanymi ze swych antyoksydacyjnych właściwości, także inne lipidy prenylowe mogą uczestniczyć w neutralizacji RFT, powstających jako produkt uboczny wielu procesów metabolicznych. Dotyczy to grupy chinonów prenylowych, takich jak: PQ-9, UQ-10 oraz  $\alpha$ -TQ, które w zredukowanej postaci (PQH<sub>2</sub>-9, UQH<sub>2</sub>-10,  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub>) także mogą wykazywać działanie przeciwutleniające. Jednak w badaniach poświęconych właściwościom antyoksydacyjnym lipidów prenylowych zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, niewiele uwagi poświęcono badaniom porównawczym tych związków, co stanowiło cel tej pracy. W niniejszej pracy skoncentrowano się na pomiarach efektywności wygaszania <sup>1</sup>O<sub>2</sub> przez lipidy prenylowe, a także ich udziale w hamowaniu reakcji peroksydacji lipidów błonowych. Poświęcono również dużo uwagi PC, będącego najslabiej poznanym, spośród wszystkich lipidów prenylowych.

#### 4.1. Dystrybucja chromanoli w olejach roślinnych

Zawartość PC w niektórych olejach roślinnych była analizowana już wcześniej. Wyniki tych badań wskazują, że najbogatszym źródłem tego związku jest olej lniany i rzepakowy (Balz i in., 1992; Goffman i Möller, 2000; Velasco i Goffman, 2000; Ahmed i in., 2005). Wyniki te znalazły potwierdzenie także w przeprowadzonych obecnie analizach (Tabela 3). Zawartość PC we wszystkich czterech analizowanych olejach lnianych wynosiła od 17-30 mg/100 g oleju i była wyższa od wartości podawanych w literaturze (4-17 mg/100g oleju) (Balz i in., 1992; Velasco i Goffman, 2000; Ahmed i in., 2005). Różnice w zawartości PC w olejach pochodzących z tego samego gatunku mogą wynikać ze sposobu obróbki surowca, a także z warunków uprawy roślin wykorzystanych do wytwarzania oleju (Coors i Montag, 1988). Większość olejów analizowanych w niniejszej pracy stanowiły oleje tłoczone na zimno, a więc w warunkach zapewniających zachowanie wszystkich ich składników w niezmienionym stanie. Podobnie jak w przypadku olejów lnianych, także zawartość PC w badanych olejach rzepakowych (Tabela 3) była wyższa od wcześniej opisanych w literaturze (2,8-8,2 mg/100g oleju; Balz i in., 1992; Velasco i Goffman, 2000; Ahmed i in., 2005). Wysoką zawartością PC charakteryzował się również olej z lnicznika (4,3 mg/100 g oleju; Tabela 3), która także była wyższa od uprzednio publikowanych (1,5, mg/100g oleju) (Zubr i Matthäus, 2002). Natomiast

poziom PC, uzyskany dla oleju z konopi (Tabela 3) był niższy w porównaniu z danymi literaturowymi (Kreise i in., 2004). W przypadku olejów, takich jak olej arachidowy, z pestek winogron i kukurydziany, u których obecność PC nie była wcześniej podawana, przeprowadzone obecnie analizy wykazały jego występowanie na poziomie powyżej 1mg/100g oleju (Tabela 3).

Dane dotyczące zawartości Tt w badanych olejach (Tabela 3) wykazały, że najwyższą zawartością tych związków charakteryzował się olej z ryżu, co pozostaje w zgodzie z danymi literaturowymi (Ong, 1993; Packer i in., 2001). Obecność izomerów Tt wykazały niemal wszystkie pozostałe badane przeze mnie oleje (Tabela 3), choć często zawartości te były bardzo niskie i nie przekraczały 0,1 mg/100g oleju.

Wyniki dotyczące zawartości izomerów Toc w analizowanych olejach, odpowiadały danym literaturowym (Coors i Motag, 1988; Balz i in., 1992; Goffman i Möller, 2000; Velasco i Goffman, 2000; Zubr i Matthäus, 2002; Kreise i in., 2004; Ahmed i in., 2005; Crews i in, 2006; Kornsteiner i in., 2006), przy czym proporcja PC do poziomu pozostałych tokochromanoli (Toc i Tt) często była wyższa w porównaniu z opublikowanymi danymi. W przypadku oleju lnianego PC stanowił 62-100% zawartości tokochromanoli, w przeciwieństwie do danych literaturowych, gdzie jego poziom wynosił 6-48% pozostałych tokochromanoli (Velasco i Goffman, 2000; Packer i in., 2001; Ahmed i in., 2005). Podobne różnice stwierdzono także dla oleju rzepakowego (19-24,4% - obecne badania i 6-11% - dane literaturowe; Balz i in., 1992; Goffman i Möller, 2000; Ahmed i in., 2005) i oleju z lniczka (9% - obecne wyniki i 2% - wyniki uprzednio publikowane; Zubr i Matthäus, 2002). Jedną z przyczyn tych rozbieżności może być zawyżony poziom tokoferoli we wcześniej publikowanych wynikach, związany z zastosowaniem niedostatecznie czystych roztworów wzorcowych tych związków. Analizy przeprowadzone w ramach niniejszej pracy oparto na pomiarach fluorescencji tych związków, które są dokładniejsze od zazwyczaj stosowanych pomiarów na podstawie absorpcji i pozwalają uniknąć błędów tego typu.

#### 4.2. Lipidy prenyłowe jako efektywne wygaszacze tlenu singletowego

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że wartości stałych szybkości wygaszania  $^1\text{O}_2$  ( $k_Q$ ) otrzymane dla różnych tokoferoli uzależnione były od ilości grup metylowych w pierścieniu chromanolowym. Niezależnie od polarności rozpuszczalnika zastosowanego do wyznaczenia  $k_Q$ , największą efektywność w wygaszaniu  $^1\text{O}_2$  charakteryzował się, posiadający trzy grupy metylowe w pierścieniu chromanolowym,  $\alpha$ -Toc. Natomiast najniższe wartości  $k_Q$

#### 4. Dyskusja

---

otrzymano dla  $\delta$ -Toc, którego pierścień zawiera tylko jedną grupę metylową. Publikowane wcześniej wyniki badań dotyczących zdolności gaszenia  $^1\text{O}_2$  przez poszczególne izomery Toc w rozpuszczalnikach organicznych były zgodne z prezentowanymi w tej pracy (Di Mascio i in., 1990; Neely i in., 1988; Kaiser i in., 1990; Mukai i in., 1991) i korelowały z potencjałem redoks tokoferoli (Mukai i in., 1991). Zależność wartości stałych wygaszania od polarności rozpuszczalnika (Rys. 20) wskazuje, że mechanizm wygaszania  $^1\text{O}_2$  przez Toc polega na przeniesieniu ładunku (ang. charge-transfer mechanizm) (Bonesi i in., 2006).

Wartości  $k_Q$  uzyskane dla poszczególnych tokotrienoli, zbliżone do tych otrzymanych dla odpowiadających im tokoferoli, świadczą o tym że stopień nasycenia łańcucha bocznego nie ma istotnego wpływu na zdolność do wygaszania  $^1\text{O}_2$ . Jedynie w przypadku  $\delta$ -Toc i  $\delta$ -Tt wartości stałej  $k_Q$  wyznaczonej w  $\text{CCl}_4$ , wykazywały znaczące różnice (Tabela 4 i 5). Również stała  $k_Q$  uzyskana dla PC w acetonitrylu była podobna do wartości otrzymanych dla  $\gamma$ -Toc i  $\gamma$ -Tt, podczas gdy w  $\text{CCl}_4$ , jej wartość była 1,5 razy wyższa w porównaniu z odpowiednimi stałymi dla obu  $\gamma$ -tokochromanoli (Tabela 4-6). Różnice te uwarunkowane są obecnością wiązań podwójnych w łańcuchu bocznym Tt i PC.

Zdolność do efektywnego wygaszania  $^1\text{O}_2$  przez związki zawierające w swych cząsteczkach nienasycone wiązania pomiędzy atomami węgla o układzie sprzężonym była obserwowana już wcześniej. Przykładem mogą być karotenoidy znane ze swych zdolności do wygaszania  $^1\text{O}_2$  (Di Mascio i in., 1990). Także związki posiadające wiązania podwójne o układzie izolowanym mogą być skutecznymi wygaszaczami, szczególnie gdy wiązanie to występuje się przy trzeciorzędowym atomie węgla, jak w cząsteczkach lipidów prenylowych. Efekt ten obserwowano np. w przypadku 2-metylo-2-butenu, dla którego stała  $k_Q$  wyznaczona w metanolu wynosiła  $2,45 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Bonesi i in., 2006). Także kwasy tłuszczowe z racji posiadania wiązań nienasyconych posiadają zdolność do wygaszania  $^1\text{O}_2$ , dla których wartość stałej wygaszania wzrasta wraz ze wzrostem liczby wiązań podwójnych w cząsteczce (Krasnovsky i in., 1983). Przykładowo wyznaczone w  $\text{CCl}_4$  wartości stałych  $k_Q$  dla kwasu stearynowego, oleinowego, linolowego oraz linolenowego wynoszą odpowiednio  $0,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $4,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  i  $8,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Wpływ wiązań podwójnych na wydajność gaszenia  $^1\text{O}_2$  przez cząsteczki tokochromanoli w rozpuszczalnikach polarnych jest zdecydowanie mniejszy w porównaniu do tego pochodzącego od pierścienia (Bonesi i in., 2006), dlatego też efekt gaszenia pochodzący od łańcucha bocznego był wyraźnie widoczny jedynie w przypadku  $k_Q$  dla PC i  $\gamma$ -Tt mierzonych w  $\text{CCl}_4$ .

Relatywnie wysokie wartości stałych  $k_Q$  otrzymanych dla PC wskazują, że związek ten obok pozostałych chromanoli może pełnić rolę wydajnego antyoksydanta również w warunkach *in vivo*.

Wśród badanych chinoli prenylowych najwyższą wydajnością wygaszania  $^1O_2$  charakteryzował się  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub>. Niższe wartości  $k_Q$  otrzymano dla UQH<sub>2</sub>-10 oraz PQH<sub>2</sub>-9 i jego utlenionej formy.

$\alpha$ -TQH<sub>2</sub> znany jest ze swej wysokiej aktywności przeciwutleniającej (Kruk i in., 1994, 1997; Mukai i in., 1993; Niki, 2007). Jednak jego zdolności do wygaszania  $^1O_2$  są nadal słabo poznane (Mukai i in., 1993). Stała  $k_Q$  dla  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub> mierzona w metanolu wyznaczona przez Mukai i jego współpracowników była niższa od  $\alpha$ -Toc, natomiast stałe szybkości wygaszania  $^1O_2$  dla  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub> otrzymane w ramach niniejszej pracy były wyższe od  $k_Q$  uzyskanych dla  $\alpha$ -Toc zarówno w acetonitrylu (ok. 1,5-krotnie) jak i w CCl<sub>4</sub> (2-krotnie) (Tabela 4 i 6). Tak wysokie wartości stałych  $k_Q$ , uzyskane dla  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub> sugerują, że związek ten może odgrywać rolę skutecznego zmiatacza  $^1O_2$  także *in vivo*, pomimo, że jego zawartość w liściach roślin jest niska. Przyczyną wykrywania tak niskich poziomów tego związku może być także jego utlenianie do  $\alpha$ -TQ podczas ekstrakcji z materiału roślinnego (Kruk i in., 2008). Wykazano, że w warunkach *in vivo*  $\alpha$ -TQ nie ulega redukcji do  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub> przy udziale PSII (Kruk i in., 1998). Jego powstawanie może być natomiast związane z nieenzymatyczną redukcją  $\alpha$ -TQ przy udziale askorbinianu (Grams, 1971) i jest to prawdopodobny sposób formowania się  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub> w błonach tylakoidów w czasie stresu świetlnego, kiedy to następuje kumulacja  $\alpha$ -TQ powstającego w wyniku utleniania  $\alpha$ -Toc (Kruk i Trebst, 2008). Dla potwierdzenia tej hipotezy konieczne są jednak dalsze badania.

Postuluje się także, że w obrębie PSII, obok  $\alpha$ -Toc, także PQH<sub>2</sub>-9 może pełnić rolę wygaszacza  $^1O_2$  (Kruk i Trebst, 2008), jednak jak dotąd jego udział w tym procesie nie został wystarczająco zbadany. Pomimo, że stałe  $k_Q$  wyznaczone dla PQH<sub>2</sub>-9 w porównaniu do  $\alpha$ -Toc są trzy razy niższe w rozpuszczalniku polarnym (acetonitryl) i sześć razy niższe w rozpuszczalniku hydrofobowym (CCl<sub>4</sub>), to lokalizacja PQH<sub>2</sub>-9 w hydrofobowym wnętrzu błony (Kruk, 1988; Kruk i in., 1992, 1993, 2006) może być przyczyną efektywniejszego wygaszania  $^1O_2$  przez ten związek, w przeciwieństwie do  $\alpha$ -Toc, którego część pierścieniowa (biorąca udział w gaszeniu  $^1O_2$ ) skierowana jest do powierzchni błony (Kruk i in., 2006). Pomiary wydajności wygaszania  $^1O_2$  przez utlenioną formę PQH<sub>2</sub>-9 wykazały, że stała  $k_Q$  otrzymana dla PQ-9 w acetonitrylu była 5-krotnie niższa w stosunku do  $k_Q$  uzyskanej dla PQH<sub>2</sub>-9. Natomiast efektywność wygaszania  $^1O_2$  przez PQ-9 w CCl<sub>4</sub>, była 3,5 niższa w porównaniu do PQH<sub>2</sub>-9. Ta wyższa wydajność gaszenia  $^1O_2$  w środowisku hydrofobowym, podobnie jak w przypadku  $\gamma$ -Tt i PC, może być

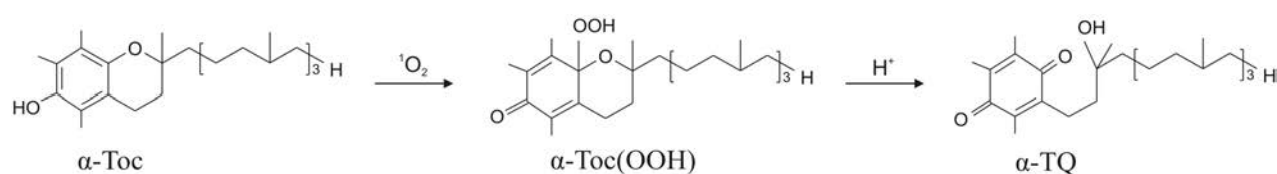


## 4. Dyskusja

uwarunkowana udziałem łańcucha bocznego w tym procesie. Wartości stałych  $k_Q$  otrzymanych dla PQ-9 mogą sugerować, że związek ten wraz z jego zredukowaną formą może brać udział w gaszeniu  $^1O_2$  także w warunkach *in vivo*. Należy zauważyć, że czas życia  $^1O_2$ , powstającego w błonach tylakoidów jest wydłużony ze względu na hydrofobowy charakter wnętrza błony, co pozwala tej RFT na dyfuzję na znaczne odległości, nawet poza obszar błony (Fisher i in., 2007). Stąd wysoka mobilność obu form plastochinonu (Millner i Barber, 1984) dodatkowo przemawia za hipotezą, że związki te mogą pełnić rolę wydajnych zmiataczy  $^1O_2$  w obrębie błon tylakoidów.

### 4.3. Produkty reakcji lipidów prenylowych z tlenem singletowym

Produkty utleniania Toc pod wpływem  $^1O_2$  były już wcześniej szczegółowo analizowane (Clough i in., 1979; Grams, 1971; Grams i in., 1972; Yamauchi i Matsushita, 1979). Wyniki tych badań wskazują, że pierwszym stabilnym produktem utleniania  $\alpha$ -Toc jest 8a-wodoronadtlenek  $\alpha$ -tokoferolu ( $\alpha$ -TOOH), co znalazło również potwierdzenie w przeprowadzonych obecnie badaniach. Po zakwaszeniu, związek ten szybko ulega przekształceniu do  $\alpha$ -TQ oraz jego epoksydu, przy czym ten drugi jest produktem dominującym (Clough i in., 1979; Grams i in., 1972). Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza związków powstających w wyniku chemicznej reakcji  $\alpha$ -Toc z  $^1O_2$  nie wykazała obecności epoksydu  $\alpha$ -TQ wśród produktów tej reakcji, pomimo zastosowania procedury opisanej w (Grams, 1971), polegającej na rozkładzie  $\alpha$ -TOOH w środowisku kwaśnym, na kolumnie z żelom krzemionkowym. Proponowany mechanizm formowania się produktów utleniania  $\alpha$ -Toc przy udziale  $^1O_2$  przedstawiono poniżej (Rys. 61).



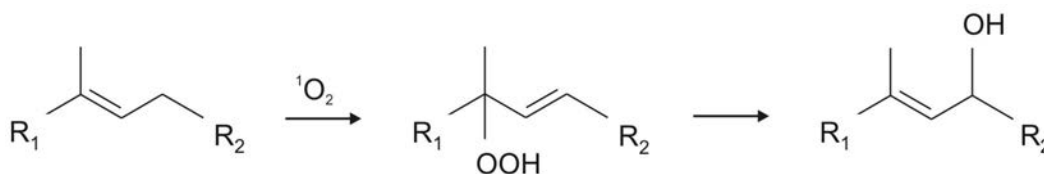
**Rys. 61.** Proponowany mechanizm tworzenia się pochodnych  $\alpha$ -Toc w reakcji z tlenem singletowym.

Prawdopodobnie  $\alpha$ -TOOH, jako pierwotny produkt utleniania  $\alpha$ -Toc, powstaje także w warunkach *in vivo*, w błonach tylakoidów. Związek ten następnie jest przekształcany do  $\alpha$ -TQ, w warunkach kwasowych tworzących się w przestrzeni międzybłonowej tylakoidów (lumen), pod wpływem silnego światła. Badania przeprowadzone na komórkach *Chlamydomonas reinhardtii*

#### 4. Dyskusja

wykazały, że w warunkach stresu świetlnego,  $\alpha$ -TQ tworzy się kosztem  $\alpha$ -Toc (Kruk i Trebst, 2008), przy czym ilość powstającego  $\alpha$ -TQ odpowiada jedynie części skonsumowanego  $\alpha$ -Toc. Wyniki tych doświadczeń nie ujawniły obecności innych produktów utleniania  $\alpha$ -Toc. Prawdopodobnie część utlenionego  $\alpha$ -Toc pozostaje w formie  $\alpha$ -TOOH, który nie ulega przekształceniu do  $\alpha$ -TQ. Gromadzenie się  $\alpha$ -TOOH może być szkodliwe dla komórki, gdyż podobnie jak w przypadku nadtlenków kwasów tłuszczowych, związek ten w obecności jonów metali przejściowych, czy też na drodze mechanizmu Russella, może prowadzić do inicjacji reakcji peroksydacji (Miyamoto i in., 2007). Jak dotąd nie zostały również poznane szlaki regeneracji  $\alpha$ -TQ do  $\alpha$ -Toc. Zachodzenie tego procesu obserwowano wprawdzie w obecności askorbinianu w doświadczeniach *in vitro* (Grams, 1971), jednak możliwość zachodzenia tej reakcji w warunkach *in vivo* nie została dotychczas stwierdzona. Z kolei badania przeprowadzone na mutantach *Arabidopsis thaliana* wykazały, że resynteza  $\alpha$ -Toc z  $\alpha$ -TQ zachodzi na drodze dehydratacji (przy udziale niezidentyfikowanej dehydratazy)  $\alpha$ -TQ lub  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub> do TMPBQ (2,3,5-trimetylo-6-fitylo-1,4-benzochinonu) lub jego zredukowanej formy TMPBQH<sub>2</sub>, będących produktami pośrednimi, oraz ich cyklizacji do  $\alpha$ -Toc przy udziale cyklazy tokoferolowej (Kobayashi i DellaPenna, 2008).

Obecnie otrzymane wyniki wykazały, że pierwszymi produktami utleniania badanych chinonoli prenylowych pod wpływem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> były ich formy utlenione. PC oraz chinony posiadające w łańcuchu bocznym wiązania podwójne ulegały dalszemu utlenianiu, co prowadziło do powstawania ich hydroksylowych pochodnych. Mechanizm tworzenia się tych pochodnych jest prawdopodobnie analogiczny do powstawania pochodnych cholesterolu, gdzie <sup>1</sup>O<sub>2</sub> wiąże się z trzeciorzędowym atomem węgla, połączonym z kolejnym atomem węgla wiązaniem podwójnym, i po przegrupowaniu wiązań nienasyconych powstaje produkt z drugorzędową grupą –OH (Rys. 62).



Rys. 62. Schemat utleniania łańcucha bocznego chinonów prenylowych pod wpływem tlenu singletowego.

Jeden z produktów utleniania PQH<sub>2</sub>-9/PQ-9 charakteryzował się właściwościami spektroskopowymi i chromatograficznymi podobnymi do PQ-C, związku, który wykrywany był w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii*, a także u wielu gatunków roślin, szczególnie w starszych liściach (Kruk i Trebst, 2008). Jednak tworzenie się PQ-C obserwowane u

*Chlamydomonas reinhardtii* nie było związane z ekspozycją komórek glonu na silne światło i postulowano, że jego synteza zachodzi raczej *de novo* (Kruk i Trebst, 2008). W świetle prezentowanych obecnie wyników kwestia pochodzenia PQ-C pozostaje otwarta i wymaga dalszych badań.

### 4.4. Udział $\alpha$ - tokoferolu i plastochinonu w odpowiedzi na stres świetlny u *Chlamydomonas reinhardtii*

Podczas stresu świetlnego dochodzi do generacji RFT w błonach tylakoidów, m.in.  $^1\text{O}_2$ , który może prowadzić do uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego i inhibicji procesu fotosyntezy (Hideg i in., 1994; Fufezan i in., 2002; Krieger-Liszkay, 2005; Ledford i Nigoyi, 2005; Krieger-Liszkay i Trebst, 2006). Wyniki badań kilku ostatnich lat wykazały, że  $\alpha$ -Toc znany ze swych właściwości antyoksydacyjnych, jest także skutecznym wygaszaczem  $^1\text{O}_2$  wytwarzanego w obrębie PSII u *Chlamydomonas reinhardtii* (Trebst i in., 2002; Kruk i in., 2005).

W błonach tylakoidów obecny jest jeszcze jeden lipid prenylowy, PQ-9, który w formie zredukowanej (PQH<sub>2</sub>-9) charakteryzuje się właściwościami przeciwutleniającymi silniejszymi niż  $\alpha$ -Toc (Kruk i in., 1994, 1997, 2003; Hundal i in., 1995). Postuluje się także, że podobnie jak  $\alpha$ -Toc, może on pełnić rolę efektywnego wygaszacza  $^1\text{O}_2$  (Kruk i Trebst, 2008). Dodatkowo za tą hipotezą przemawiają wysokie stałe  $k_Q$  prezentowane w tej pracy. W celu zweryfikowania tych założeń badano udział PQH<sub>2</sub>-9 i  $\alpha$ -Toc w gaszeniu  $^1\text{O}_2$  w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii*, generowanego w warunkach stresu świetlnego.

Detekcja  $^1\text{O}_2$  w żywych komórkach jest utrudniona ze względu na jego wysoką reaktywność i krótki czas życia. Większość znanych metod (pomiar luminescencji  $^1\text{O}_2$ , spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego) nadaje się do stosowania jedynie w prostych układach *in vitro* (Triantaphylides i Havaux, 2009). W badaniach *in vivo* stosuje się zwykle techniki oparte na sondach fluorescencyjnych, które wprowadzone do komórki oddziałują specyficznie z określoną RFT (Hideg i in., 2001; Baroli i in., 2004; Wagner i in., 2004; Flors i in., 2006). Poza detekcją bezpośrednią, stosowane są także metody pośrednie oparte na analizie odpowiedzi komórki na stres wywołany  $^1\text{O}_2$  (badanie poziomu produktów reakcji składników komórki z  $^1\text{O}_2$ ; analiza aktywności genów, w których ekspresję zaangażowany jest  $^1\text{O}_2$ ) (Laloi i in., 2007; Triantaphylides i in., 2008). Jednak metody te nie są uniwersalne. Bardzo często możliwość ich zastosowania uzależniona jest od rodzaju materiału doświadczalnego (różnice w penetracji i dyfuzji sondy w poszczególnych tkankach roślinnych,

brak wystarczającej selektywności działania, wrażliwość na światło, czy interferencja widma fluorescencji z innymi składnikami komórki, np. chlorofilem). Opracowana w ramach tej pracy metoda detekcji  $^1\text{O}_2$  przy użyciu 6-difenylo-1,3,5-heksatrienu (DPH), okazała się skutecznym narzędziem wykrywania  $^1\text{O}_2$  zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* (Rys. 29-33, Tabela 7). Pomiar poziomu  $\alpha$ -Toc oraz PQH<sub>2</sub>-9/PQ-9 w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii*, poddanych działaniu inhibitora biosyntezy tych związków (pirazolanu) oraz w hodowli kontrolnej, podczas oświetlania ich silnym światłem wykazały wzmożoną produkcję  $^1\text{O}_2$  przy zahamowanej syntezie prenylolipidów (Rys. 37 i 39, Tabela 8 i 9). Różnice w konsumpcji tych związków w hodowlach oświetlanych bez dodatku i w obecności pirazolanu wskazują na ich udział w zmiataniu  $^1\text{O}_2$ . Dodatkowo potwierdzeniem udziału  $^1\text{O}_2$  w badanych reakcjach był znacznie szybszy rozkład lipidów przenyloowych w obecności D<sub>2</sub>O, w której czas życia  $^1\text{O}_2$  jest znacznie wydłużony (Rys. 38 i 40, Tabela 8 i 9).

Należy dodać, że w warunkach stresu świetlnego, w obrębie błon tylakoidów poza  $^1\text{O}_2$  generowany jest także  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Rys.11A), który podobnie jak  $^1\text{O}_2$  ma zdolność do utleniania obu analizowanych lipidów prenyloowych (Kruk i in., 2003; Ivanov i in., 2007). Wyniki doświadczeń z użyciem tetranitrometanu, będącego aktywnym wygaszaczem  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , wykazały jednak że jego udział w badanych procesach jest znikomy i obserwowane efekty wywołane są działaniem  $^1\text{O}_2$  (Rys. 41-43, Tabela 12)

Ponieważ lipidy prenylowe w obrębie chloroplastów mogą występować poza błonami fotosyntetycznymi (tylakoidami) także w tzw. plastoglobulach, interesujące było zbadanie jak przedstawia się 'rozkład' badanych lipidów prenyloowych u *Chlamydomonas reinhardtii* pomiędzy tymi kompartmentami chloroplastowymi, oraz czy  $^1\text{O}_2$  jest w stanie oddziaływać z lipidami prenylowymi w obu miejscach. Przedstawione wyniki analiz obu frakcji (Tabela 10 i 11) wskazują jednak, że u badanego organizmu ilość lipidów pozabłonowych jest bardzo niska i nie może mieć większego udziału w obserwowanych efektach.

### 4.5. Udział lipidów prenyloowych w hamowaniu reakcji peroksydacji błon liposomów

Wolnorodnikowa peroksydacja lipidów jest procesem, który od lat budzi zainteresowanie badaczy, m.in. ze względu na wpływ tego procesu na właściwości błon biologicznych. Na przestrzeni lat rozwinęło się również wiele technik umożliwiających badanie tej reakcji. W doświadczeniach *in vitro* generację peroksydacji prowadzono m.in. przy zastosowaniu podwyższonej temperatury (Olejnik i in, 1997), jonów  $\text{Fe}^{2+}$  (Kruk i in., 1997a), sonolizy (Kruk i

in., 1994) oraz homolizy cząsteczek inicjatorów (Yoshida i in., 2003). W niniejszej pracy porównywano zdolność do hamowania procesu peroksydacji lipidów przez poszczególne lipidy prenylowe w warunkach *in vitro*, z zastosowaniem azoinicjatorów. W celu dokonania oceny miejsca działania badanych lipidów prenylowych w błonie, generację reakcji peroksydacji prowadzono w dwóch różnych układach, na zewnątrz (AAPH) i wewnątrz błony liposomowej (AMVN). Zaletą związków użytych do generacji peroksydacji była stała szybkość wytwarzania wolnych rodników w stosowanej temperaturze (37°C).

Spośród wszystkich analizowanych lipidów prenylowych, w badaniach nad zdolnością hamowania reakcji peroksydacji dotychczas najczęściej miejsca w literaturze poświęcono Toc i Tt. Wyniki przeprowadzonych analiz *in vitro* wykazały, że zdolność przerywania reakcji peroksydacji przez poszczególne izomery Toc i Tt maleje w następującym porządku:  $\alpha > \beta - \gamma > \delta$  (Yoshida i in., 2003, 2007). Wyniki badań przeprowadzonych w niniejszej pracy wykazały, że w układzie z AAPH zarówno  $\alpha$ -Toc, jak i  $\gamma$ -Toc (nieco słabiej) skutecznie hamowały peroksydację lipidów liposomowych już przy stężeniu 2 $\mu$ M (Rys. 47). Natomiast w układzie z AMVN, w przypadku  $\gamma$ -Toc o najniższym stężeniu (2 $\mu$ M) hamowanie reakcji peroksydacji było zdecydowanie słabsze w porównaniu do układu z AAPH, zaś przy wyższym stężeniu nie obserwowano hamującego wpływu tego związku (Rys. 56). W przypadku  $\alpha$ -Toc obserwowano efekt prooksydacyjny, który był tym silniejszy im wyższe było stężenie użytego  $\alpha$ -Toc (Rys. 58). Duża efektywność w hamowaniu reakcji peroksydacji przez badane tokoferole, generowanej przy powierzchni błony liposomowej wynika z orientacji ich cząsteczek w błonie. Mianowicie część pierścieniowa, odpowiedzialna za zdolność do antyoksydacyjnego działania tych związków, zlokalizowana jest przy powierzchni błony. Natomiast słaby efekt hamowania tej reakcji generowanej we wnętrzu błony przez  $\gamma$ -Toc oraz jego brak w przypadku  $\alpha$ -Toc, może być związany ze słabą penetracją wnętrza błony przez cząsteczki tych związków. Potwierdzają to badania porównawcze zdolności hamowania reakcji peroksydacji  $\alpha$ -Toc i  $\alpha$ -Tt. Pomimo, że oba homologii wykazują zbliżoną efektywność w hamowaniu procesu peroksydacji, to w sytuacji gdy w środowisku reakcji obecny był  $\alpha$ -Toc i  $\alpha$ -Tt, ten drugi ulegał szybszemu zużyciu, co świadczy o większej mobilności tego związku w błonie (Yoshida i in., 2003). Dodatkowo tokotrienole znacznie łatwiej wbudowują się w matrycę błon (Sen i in., 2000; Noguchi i in., 2003).

Natomiast zjawisko prooksydacyjnego działania  $\alpha$ -Toc było już wcześniej obserwowane w doświadczeniach *in vitro* prowadzonych na ludzkich LDL (Inglod i in., 1993; Bernard i in., 2001). Jest ono tłumaczone tym, że jeżeli dojdzie do zachwiania równowagi w błonie (zbyt duże nagromadzenie wolnych rodników, w tym również  $\alpha$ -TO $\cdot$ ) zwłaszcza w warunkach, gdy nie może dojść do regeneracji  $\alpha$ -TO $\cdot$ , np. przy udziale Asc, nagromadzone rodniki  $\alpha$ -TO $\cdot$  wraz z

#### 4. Dyskusja

---

inicjatorami prowadzą do przyspieszenia procesu peroksydacji (Niki i Noguchi, 2004; Gille i in., 2008). Narastanie efektu prooksydacyjnego  $\alpha$ -Toc i brak hamowania peroksydacji przez  $\gamma$ -Toc w liposomach o wyższym stężeniu tych związków może być też efektem zaburzenia struktury błony przez cząsteczki tokoferoli (Hincha, 2008).

Dane literaturowe dotyczące badań nad udziałem lipidów prenylowych w hamowaniu reakcji peroksydacji wskazują, że obok Toc i Tt, także PC (Olejnik i in., 1997) UQH<sub>2</sub>-10 (Ernster i Dallner, 1995; Bentinger i in., 2007),  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub> (Mukai i in., 1993b; Kruk i in., 1997a,) oraz PQH<sub>2</sub>-9 (Hundal i in., 1995; Kruk i in., 1994, 1997a) mogą brać udział w hamowaniu tego procesu.

Spośród badanych chromanoli najwyższą aktywność hamowania reakcji peroksydacji w obu zastosowanych układach wykazywał PC (Rys. 47 i 54). Ta wysoka wydajność hamowania peroksydacji przez ten związek może być związana z jego większą mobilnością w błonie w porównaniu do tokoferoli, podobnie jak ma to miejsce w przypadku  $\alpha$ -Toc oraz  $\alpha$ -Tt (Yoshida i in., 2003). Otrzymane w tej pracy wyniki mogą wskazywać na ważną rolę PC w tego typu reakcjach także w warunkach *in vivo*.

Uzyskane wyniki wskazują, że spośród testowanych chinoli prenylowych, reakcję peroksydacji najwydajniej hamował PQH<sub>2</sub>-9. Związek ten okazał się doskonałym inhibitorem zarówno w układzie z AAPH, jak i AMVN jako inicjatorami (Rys. 49 i 52). PQH<sub>2</sub>-9 w układzie z AAPH był efektywniejszy od  $\alpha$ -Toc i nieco mniej aktywny od PC. Natomiast w układzie z AMVN, PQH<sub>2</sub>-9 hamował reakcję peroksydacji wydajniej niż PC. Nieco słabsze działanie hamujące w układzie z AAPH wykazywał UQH<sub>2</sub>-10, najslabiej zaś działał  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub> (Rys. 49). Otrzymane wyniki różnią się od publikowanych wcześniej doniesień dotyczących hamowania reakcji peroksydacji lipidów przez chinole prenylowe (Mukai i in., 1993; Kruk i in., 1994, 1997a). Rozbieżności te mogą być tłumaczone zastosowaniem w tych badaniach innych metod inicjacji peroksydacji oraz innych układów (liposomy lecytynowe, rozpuszczalniki organiczne). Wysoka aktywność w hamowaniu reakcji peroksydacji przez PQH<sub>2</sub>-9 oraz UQH<sub>2</sub>-10 może być związana z wysoką mobilnością tych związków w błonach. Wyniki wcześniejszych badań oraz tych prezentowanych w niniejszej pracy wskazują zatem, że poza Toc i Tt także inne lipidy prenylowe takie jak PC, PQH<sub>2</sub>-9 i  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub> mogą pełnić rolę antyoksydantów w warunkach *in vivo*.

### 5. Wnioski

- badania porównawcze zdolności wygaszania  $^1\text{O}_2$  przez lipidy prenylowe, w rozpuszczalnikach organicznych o różnej polarności wykazały, że w grupie chromanoli wydajność wygaszania rośnie wraz ze wzrostem liczby grup metylowych w pierścieniu oraz polarnością rozpuszczalnika. W przypadku PC, obserwowano także udział łańcucha bocznego w tym procesie. Wśród analizowanych chinoli prenylowych najsilniejszym wygaszczem  $^1\text{O}_2$  był  $\alpha\text{-TQH}_2$
- wyniki analizy produktów reakcji chemicznej lipidów prenylowych z  $^1\text{O}_2$  wykazały, że głównymi produktami utleniania chinoli prenylowych były odpowiednie chinony, które następnie (z wyjątkiem  $\alpha\text{-TQH}_2$ ) ulegały dalszemu utlenianiu do hydroksylowych pochodnych w łańcuchu bocznym
- pomiar fluorescencji DPH (zanikającej na skutek utleniania wiązań podwójnych w tym związku przez  $^1\text{O}_2$ ) okazał się skuteczną metodą detekcji  $^1\text{O}_2$ , zarówno w układach modelowych (liposomy), jak również *in vivo* (komórki *Chlamydomonas reinhardtii*). Technika tę zastosowano do wykazania wzmożonej produkcji  $^1\text{O}_2$  w komórkach *Chlamydomonas* w czasie stresu świetlnego
- różnice poziomu lipidów prenylowych w komórkach *Chlamydomonas* w czasie stresu świetlnego, przy braku oraz w obecności inhibitora syntezy tych związków, sugerują wzmożone wytwarzanie  $^1\text{O}_2$  w obrębie PSII przy zahamowaniu biosyntezy lipidów prenylowych. Otrzymane wyniki wskazują także na udział  $\alpha\text{-Toc}$  oraz PQH<sub>2</sub>-9 jako zmiataaczy  $^1\text{O}_2$  w czasie stresu świetlnego
- analiza zdolności hamowania procesu peroksydacji lipidów błon liposomów przez wbudowane w nie lipidy prenylowe, inicjowanego na zewnątrz (AAPH) lub wewnątrz błon (AMNV), wykazała wyraźną zależność pomiędzy lokalizacją badanego lipidu prenylowego w błonie i jego efektywnością w hamowaniu tego procesu. Wszystkie testowane chromanole skutecznie hamowały reakcję peroksydacji generowaną na zewnątrz błon, najsilniej zaś PC. W układzie, gdzie reakcja peroksydacji generowana była wewnątrz błony liposomowej, reakcję tę skutecznie hamował jedynie PC spośród chromanoli, który ze względu na obecność długiego, nienasyconego łańcucha bocznego posiada większą zdolność do penetracji błony komórkowej niż tokoferole. Wśród testowanych chinoli prenylowych, najwydajniejszym inhibitorem tego procesu w obu układach był PQH<sub>2</sub>-9, odznaczający się wysoką mobilnością w błonie

### 6. Streszczenie

Lipidy prenylowe to grupa niepolarnych, drobnocząsteczkowych związków o podstawowym znaczeniu w metabolizmie roślin i zwierząt. Należą do nich chromanole obejmujące tokoferole (Toc), tokotrienole (Tt), oraz plastochromanol (PC) oraz chinony prenylowe, takie jak ubichinon (UQ-10), plastochinon (PQ-9) oraz  $\alpha$ -tokoferylochinon ( $\alpha$ -TQ). Niektóre badania ostatnich lat sugerują, że chinony prenylowe w zredukowanej postaci (UQH<sub>2</sub>-10, PQH<sub>2</sub>-9,  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub>) także mogą działać jako antyoksydanty komórkowe. W badaniach nad przeciwutleniającą funkcją lipidów prenylowych, zarówno w układach *in vivo* oraz *in vitro*, dotychczas niewiele uwagi poświęcono badaniom porównawczym tych związków, co było celem niniejszej pracy. W przeprowadzonych badaniach skoncentrowano się na pomiarach aktywności gaszenia tlenu singletowego (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) przez lipidy prenylowe oraz hamowaniu reakcji peroksydacji lipidów błonowych przez te związki.

Doświadczenia dotyczące szybkości gaszenia <sup>1</sup>O<sub>2</sub> przez badane lipidy prenylowe w rozpuszczalnikach wykazały, że zdolność gaszenia <sup>1</sup>O<sub>2</sub> przez tokochromanole wzrasta wraz ze wzrostem liczby grup metylowych w pierścieniu chromanolowym i polarnością rozpuszczalnika. Wśród badanych chinoli prenylowych,  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub> okazał się najsilniejszym wygaszaczem, natomiast nieco słabszą aktywność pod tym względem wykazały UQH<sub>2</sub>-10 oraz PQH<sub>2</sub>-9. Nieoczekiwany wynik przyniosła analiza stałej dla PC, gdzie wykazano, iż w gaszeniu <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ma udział nie tylko pierścień PC ale również jego długi nienasycony łańcuch boczny.

Natomiast wyniki analizy produktów reakcji chemicznej badanych lipidów prenylowych z <sup>1</sup>O<sub>2</sub> pokazały, że głównymi produktami utleniania chinoli prenylowych były odpowiednie chinony, które następnie (z wyjątkiem  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub>) ulegały dalszemu utlenianiu do hydroksylowych pochodnych w łańcuchu bocznym.

Aby wykazać wzmożoną produkcję <sup>1</sup>O<sub>2</sub> w błonach tylakoidów glonu *Chlamydomonas reinhardtii* w warunkach stresu świetlnego, opracowano nową metodę detekcji <sup>1</sup>O<sub>2</sub> przy wykorzystaniu fluorescencji 6-difenyl-1,3,5-heksatrienu (DPH), która zanikała pod wpływem utleniania wiązań podwójnych przez <sup>1</sup>O<sub>2</sub> w tym związku. Badania przeprowadzone w układach modelowych (liposomy) jak też *in vivo* wykazały możliwość zastosowania tej metody w obu przypadkach.

Różnice poziomu lipidów prenylowych w komórkach *Chlamydomonas* w czasie stresu świetlnego, przy braku oraz w obecności inhibitora syntezy tych związków, sugerują wzmożone wytwarzanie <sup>1</sup>O<sub>2</sub> w obrębie fotosystemu II przy zahamowaniu biosyntezy lipidów prenylowych. Uzyskane wyniki wskazują także na udział  $\alpha$ -Toc oraz PQH<sub>2</sub>-9 jako zmiataczy <sup>1</sup>O<sub>2</sub> w czasie



stresu świetlnego. Potwierdzeniem udziału  $^1\text{O}_2$  w badanych reakcjach było znaczne przyspieszenie utleniania lipidów prenylowych oraz podwyższona szybkość rozkładu chlorofilu w obecności  $\text{D}_2\text{O}$ , gdzie czas życia  $^1\text{O}_2$  jest znacznie wydłużony.

W kolejnych doświadczeniach analizowano zdolność hamowania procesu peroksydacji lipidów błon liposomów przez wbudowane w nie lipidy prenylowe, gdzie reakcję peroksydacji generowano przez termiczny rozkład azoinicjatorów: AAPH na zewnątrz liposomów (generator rozpuszczalny w wodzie) lub wewnątrz błon przy wykorzystaniu AMNV (rozpuszczalny w lipidach).

Spośród analizowanych chromanoli w hamowaniu reakcji peroksydacji lipidów w układzie z AAPH najwyższą aktywność wykazywał PC. Natomiast aktywności  $\alpha$ -Toc i  $\gamma$ -Toc były do siebie podobne i zarazem nieco niższe od PC. Wśród badanych chinoli reakcja peroksydacji najsilniej była hamowana przez PQH<sub>2</sub>-9, oraz słabiej przez UQH<sub>2</sub>-10 i  $\alpha$ -TQH<sub>2</sub>. Z kolei w układzie, w którym jako generatora reakcji peroksydacji użyto AMNV, obserwowano silny efekt hamowania przez PQH<sub>2</sub>-9, nawet przy niewielkich jego stężeniach. Równie wydajnie reakcję tę hamował PC. Natomiast zdolność hamowania peroksydacji przez  $\alpha$ -Toc i  $\gamma$ -Toc w tym układzie była zdecydowanie mniejsza w porównaniu do pozostałych związków, lub nawet obserwowano efekty prooksydacyjne, jak w przypadku  $\alpha$ -Toc.

Podsumowując, wyniki pracy wskazują na wysoką aktywność antyoksydacyjną szeregu, dotychczas słabo poznanych pod tym względem, roślinnych lipidów prenylowych takich jak plastochromanol, zredukowany plastochinon czy  $\alpha$ -tokoferylochinol.

## 7. Literatura

- Ahmed M.K., Daun J.K., Przybylski R., FT-IR based methodology for quantitation of total tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 in vegetable oils (2005) *J Food Compos Anal* 18:359-364.
- Aikens J., Dix T.A., Hydrodioxy (perhydroxyl), peroxy, and hydroxyl radical-initiated lipid-peroxidation of large unilamellar vesicles (liposomes) - comparative and mechanistic studies (1993) *Arch Biochem Biophys* 305:516-525.
- Allen J.F., Bennet J., Steinback K.E., Amtzen C.J., Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems (1981) *Nature* 291:25-29.
- Apel K., Hirt H., Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction (2004) *Annu Rev Plant Biol* 55:373-399.
- Asada K., Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplast and their functions (2006) *Plant Physiol* 141:391-396.
- Azzi A., Ricciarelli R., Zingg J.-M., Non-antioxidant molecular functions of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) (2002) *FEBS Lett* 519:8-10.
- Azzi A., Stocker A., Vitamin E: non-antioxidant roles (2000) *Prog Lipid Res* 39:231-255.
- Bagci E., Bruehl L., Özçelik H., Aitzemüller K., Vural M., A study of the fatty acid and tocopherol patterns of some *Fabaceae* (*Leguminosa*) plants from Turkey I (2004) *Grasas Aceites* 55:378-384.
- Bagci E., Karaagaçlı Y., Fatty Acid and Tocopherol Patterns of Turkish Pines (2004) *Acta Biol Cracov Bot* 46:95-100.
- Balz M., Schulte E., Thier H.-P., Trennung von Tocopherolen und Tocotrienolen durch HPLC (1992) *Fat Sci Technol* 94:209-213.
- Baroli I., Gutman B.L., Ledford H.K., Shin J.W., Chin B.L., Havaux M., Niyogi K.K., Photo-oxidative stress in a xanthophyll-deficient mutant of *Chlamydomonas* (2004) *J Biol Chem* 279:6337-6344.
- Barr R.; Crane F.L., Quinones in algae and higher plants (1971) *Methods Enzymol* 23A:372-408.
- Bartosz G., Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie (2008) PWN. Warszawa.
- Bartosz G., Oxidative stress in plants (1997) *Acta Physiol Plant* 19:47-64.
- Bartosz G., Reactive oxygen species: destroyers or messengers? (2009) *Biochem Pharmacol* 77:1303-1315.
- Bentinger M., Brismar K., Dallner G., The antioxidant role of coenzyme Q (2007) *Mitochondrion* 7:41-50.
- Bergamini C.M., Gambetti S., Dondi A., Cervellati C., Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage (2004) *Curr Pharm Design* 10:1611-1626.
- Bergendi L., Benes L., Ďuračková Z., Ferenčík M., Chemistry, physiology and pathology of free radicals (1999) *Life Sci* 65:1865-1874.
- Bernard L., Young M.J., Hall D., Paul T., Ingold K.U., Quantitative studies on the peroxidation of human low-density lipoprotein initiated by superoxide and by charged and neutral alkylperoxy radicals (2001) *J Am Chem Soc* 123:12439-12448.
- Blokhina O., Fagerstedt K.V., Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation (2010) *Plant Physiol Biochem, w druku*
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V., Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review (2003) *Ann Bot* 91:179-194.

## 7. Literatura

---

- Bonesi S. M., Fagnoni M., Monti S., Albini A., Reaction of singlet oxygen with some benzylic sulphides (2006) *Tetrahedron* 62:10716-10723.
- Bouvier F., Rahier A., Camara B., Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids (2005) *Prog Lipid Res* 44:357-429.
- Bramley P.M., Elmadfa I., Kafatos A., Kelly F.J., Manios Y., Roxborough H.E., Schuch W., Sheehy P.J.A., Wagner K-H., Review vitamin E (2000) *J Sci Food Agric* 80:913-938.
- Brigelius-Flohé R., Vitamin E: the shrew waiting to be tamed (2009) *Free Radical Bio Med* 46:543-554.
- Burkitt M.J., A critical overview of the chemistry of copper-dependent low-density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin (2001) *Arch Biochem Biophys* 394:117-135.
- Cadenas E., Biochemistry of oxygen toxicity (1989) *Annu Rev Biochem* 58:79-110.
- Cadet J., Ravanat J-L., Martinez G.R., Medeiros M.H.G., Di Mascio P., Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA: product formation and mechanistic insights (2006) *Photochem Photobiol* 82:1219-1225.
- Ching L.S., Mohamed S., Alpha-tocopherol content in 62 edible tropical plants (2001) *J Agric Food Chem* 49:3101-3105.
- Chun J., Lee J., Ye L., Exler J., Eitenmiller R.R., Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet (2006) *J Food Compos Anal* 19:196-204.
- Clarke C.F., New advances in coenzyme Q biosynthesis (2000) *Protoplasma* 213:134-147.
- Clough R. L., Yee B. G., Foote C. S., Chemistry of singlet oxygen. 30. The unstable primary product of tocopherol photooxidation (1979) *J Am Chem Soc* 101:683-686.
- Clough R.L., Yee B.G., Foote C.S., Chemistry of singlet oxygen.30. The unstable primary product of tocopherol photooxidation (1979) *J Am Chem Soc* 101:683-686.
- Coors U., Montag A., Untersuchungen zur Stabilität des Tocopherolgehaltes pflanzlicher Öle (1988) *Fat Sci Technol* 90:129-136.
- Corpas F.J., Barroso J.B., del Rio L.A., Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells (2001) *Trends Plant Sci* 6:145-150.
- Crane F.L., Discovery of ubiquinone (coenzyme Q) and an overview of function (2007) *Mitochondrion* 7:2-7.
- Crane F.L., Navas P., The diversity of coenzyme Q function (1997) *Mol Aspects Med* 18:S1-S6.
- Creelman R.A., Mullet J.E., Biosynthesis and action of jasmonates in plants (1997) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:355-381.
- Crews C., Hough P., Godward J., Brereton P., Lees M., Guiet S., Winkelmann W., Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin (2006) *J Agric Food Chem* 54:6261-6265.
- Dähnhardt D., Falk J., Appel J., van der Kooij T.A.W., Schulz-Friedrich R., Krupinska K., The hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Synechocystis sp.* PCC 6803 is not required for plastoquinone biosynthesis (2002) *FEBS Lett* 523:177-181.
- Dallner G., Sindelar P.J., Regulation of ubiquinone metabolism (2000) *Free Radical Biol Med* 29:285-294.
- Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F., Dual action of the active oxygen species during plant stress responses (2000) *Cell Mol Life Sci* 171:779-795.
- Davies M., Reactive species formed on proteins to singlet oxygen (2004) *Photochem Photobiol Sci* 3:17-25.
- Davies M.J., Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 305:761-770.

## 7. Literatura

---

- De Gara L., de Pinto M.C., Tommasi F., The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction (2003) *Plant Physiol Bioch* 41:863-870.
- DellaPenna D., A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants (2005) *J Plant Physiol* 162:729-737.
- Di Mascio P., Devasagayam T.P.A., Kaiser S., Sies H., Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers (1990) *Biochem Soc Trans* 18:1054-1056.
- Dix T.A., Aikens J., Mechanism and biological relevance of lipid peroxidation initiation (1993) *Chem Res Toxicol* 6:2-18.
- Dörmann P., Functional diversity of tocopherols in plants (2007) *Planta* 225:269-276.
- Dowson R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M., eds. *Data for Biochemical Research*. 3<sup>rd</sup> Edition (1993) Oxford Science Publications.
- Edreva A., Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach (2005) *Agr Ecosyst Environ* 106:119-133.
- El Kayal W., Keller G., Debayles C., Kumar R., Weier D., Teulieres C., Marque C, Regulation of tocopherol biosynthesis through transcriptional control of tocopherol cyclase during cold hardening in *Eucalyptus gunnii* (2006) *Physiol Plantarum* 126:212-223.
- Ernster L., Dallner G., Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function (1995) *Biochim Biophys Acta* 1271:195-204.
- Fischer B.B., Krieger-Liszkay A., Hideg É., Šnyrychová I., Weisendanger M., Eggen R.I.L., Role of singlet oxygen in chloroplast to nucleus retrograde signalling in *Chlamydomonas reinhardtii* (2007) *FEBS Lett* 581:5555-5560.
- Flors C., Fryer M.J., Waring J., Reeder B., Bechtold U., Mullineaux P.M., Nonell S., Wilson M.T., Baker N.R., Imaging the production of singlet oxygen *in vivo* using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green (2006) *J Exp Bot* 57:1725-1734.
- Frei B., Kim M.C., Ames B.N., Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentration (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4879-4883.
- Fufezan C., Rutherford A.W., Krieger-Liszkay A., Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II (2002) *FEBS Lett* 532:407-410.
- Gille L., Gregor W., Staniek K., Nohl H., Redox-interaction of  $\alpha$ -tocopheryl quinone with isolated mitochondrial cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex (2004) *Biochem Pharmacol* 68:373-381.
- Gille L., Rosenau T., Kozlov A.V., Gregor W., Ubiquinone and tocopherol: dissimilar siblings (2008) *Biochem Pharmacol* 76:289-302.
- Goffman F.D., Möllers C., Changes in Tocopherol and Plastochromanol-8 Contents in Seeds and Oil of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) during Storage As Influenced by Temperature and Air Oxygen (2000) *J Agric Food Chem* 48:1605-1609.
- Grams G.W., Eskins K., Inglett G.E., Dye-sensitized photooxidation of  $\alpha$ -tocopherol (1972) *J Amer Chem Soc* 94:866-868.
- Grams G.W., Oxidation of alpha-tocopherol by singlet oxygen (1971) *Tetrahedron Lett* 50:4823-4825.
- Grusak M., DellaPenna D., Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health (1999) *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 50:133-161

## 7. Literatura

---

- Halliwell B., Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life (2006) *Plant Physiol* 141:312-322.
- Hideg E., Ogawa K., Kalai T., Hideg K., Singlet oxygen imaging in *Arabidopsis thaliana* leaves under photoinhibition by excess photosynthetically active radiation (2001) *Physiol Plant* 112:10-14.
- Hideg E., Spetea C., Vass I., Singlet oxygen production in thylakoid membranes during photoinhibition as detected by EPR spectroscopy (1994) *Photosynth Res* 39:191-199.
- Hincha D.K., Effects of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) on the stability and lipid dynamics of model membranes mimicking the lipid composition of plant chloroplast membranes (2008) *FEBS Lett* 582:3687-3692.
- Hirano M., Satoh K., Katoh S., Plastoquinone as a common link between photosynthesis and respiration in a blue-green alga (1980) *Photosynth Res* 1:149-162.
- Hofius D., Sonnewald U., Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology (2003) *Trends Plant Sci* 8:6-8.
- Horvath G., Wessjohann I., Bigirimana J., Jansen M., Guisez Y., Caubergs R., Horemans N., Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues (2006) *Phytochemistry* 67:1185-1195.
- Hughes P.E., Tove S.B., Occurrence and function of  $\alpha$ -tocopherolquinone and  $\alpha$ -tocopherolquinol in microorganisms (1982) *J Bacteriol* 151:1397-1402.
- Infante J.P., A function for the vitamin E metabolite  $\alpha$ -tocopherol quinone as an essential enzyme cofactor for the mitochondrial fatty acid desaturases (1999) *FEBS Lett* 446:1-5.
- Inglod K.U., Bowry V.W., Stocker R., Walling C., Autoxidation of lipids and antioxidation by  $\alpha$ -tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids: unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low-density lipoprotein (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:45-49.
- Itoh S., Nagaoka S., Mukai K., Kinetic study of the tocopherol regeneration reaction by biological hydroquinones in micellar solution (2008) *J Phys Chem A* 112:448-456.
- Ivanov B., Mubarakshina M., Khorobrykh S., Kinetics of the plastoquinone pool oxidation following illumination oxygen incorporation into photosynthetic electron transport chain (2007) *FEBS Lett* 581:1342-1346.
- James A.M., Smith R.A., Murphy M.P., Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial coenzyme Q (2004) *Arch Biochem Biophys* 423:47-56.
- Jemioła-Rzemińska M., Strzałka K., Significance of prenylquinones for living organisms (2005) W: Koroniak H., Barciszewski J. (red.) *Na pograniczu chemii i biologii Tom XII: str. 395-428*, Wydawnictwo Uniwersytetu Adama Mickiewicza, Poznań.
- Kagan V.E., Fabisiak J.P., Quinn P.J., Coenzyme Q and vitamin E need each other as antioxidants (2000) *Protoplasma* 214:11-18.
- Kaiser S., Di Mascio P., Murphy M.E., Sies, H., Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols (1990) *Arch Biochem Biophys* 277:101-108.
- Kamal-Eldin A., Appelqvist L.-Å., The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols (1996) *Lipids* 31:671-701.
- Karpiński S., Escobar C., Karpińska B., Creissen G., Mullineaux P.M., Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress (1997) *Plant Cell* 9:627-640.

## 7. Literatura

---

- Kim M-S., Kim H-S., Kim Y-S., Baek K-H., Oh H-W., Hahn K-W., Bae R-N., Lee I-J., Joung H., Jeon J-H., Superoxide anion regulates plant growth and tuber development of potato (2007) *Plant Cell Rep* 26:1717-1725.
- Knox P., Dodge A.D., Singlet oxygen and plants (1985) *Phytochemistry* 24:889-896.
- Kobayashi N., DellaPenna D., Tocopherol metabolism, oxidation and recycling under high light stress in *Arabidopsis* (2008) *Plant J* 55:607-618.
- Kohen R., Nyska A., Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification (2002) *Toxicol Pathol* 30:620-650.
- Kontush A., Hubner C., Finckh B., Kohlschutter A., Beisiegel U., Antioxidative activity of ubiquinol-10 at physiologic concentrations in human low density lipoprotein (1995) *Biochim Biophys Acta* 1258:177-187.
- Kornsteiner M., Wagner K-H., Elmadfa I., Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types (2006) *Food Chem* 98:381-387.
- Krasnovsky A.A., Kagan V.E., Minin A.A., Quenching of singlet oxygen luminescence by fatty acids and lipids. Contribution of physical and chemical mechanisms (1983) *FEBS Lett* 155:233-236.
- Kreise U., Schumann E., Weber W.E., Beyer M., Brühl L., Matthäus B., Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. genotypes (2004) *Euphytica* 137:339-351.
- Krieger-Liszkay A., Fufezan C., Trebst A, Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism (2008) *Photosynth Res* 98:551-564.
- Krieger-Liszkay A., Singlet oxygen production in photosynthesis (2004) *J Exp Bot* 56:337-346.
- Krieger-Liszkay A., Trebst A., Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre (2006) *J Exp Bot* 57:1677-1684.
- Kruk J., Burda K., Randuz A., Strzałka K., Schmid G.H., Antagonistic effects of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopherolquinone in the regulation of cyclic electron transport around photosystem II (1997b) *Z Naturforsch* 52c:766-774.
- Kruk J., Burda K., Schmid G.H., Radunz A., Strzałka K., Function of plastoquinones B i C as electron acceptors in photosystem II and fatty acid analysis of plastoquinone B (1998) *Photosynth Res* 58:203-209.
- Kruk J., Charge transfer complexes of plastoquinone and  $\alpha$ -tocopherol quinone in vitro (1988) *Biophys Chem* 30:143-149.
- Kruk J., Holländer-Czytko H., Oettmeier W., Trebst A., Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II (2005) *J Plant Physiol* 162:749-757.
- Kruk J., Jemioła-Rzemińska M., Burda K., Schmid G.H., Strzałka K., Scavenging of superoxide generated in photosystem I by plastoquinol and other prenyllipids in thylakoid membranes (2003) *Biochemistry* 42:8501-8505.
- Kruk J., Jemioła-Rzemińska M., Strzałka K., Plastoquinol and  $\alpha$ -tocopherol quinol are more active than ubiquinol and  $\alpha$ -tocopherol in inhibition of lipid peroxidation (1997a) *Chem Phys Lipids* 87:73-80.
- Kruk J., Karpiński S., An HPLC-based method of estimation of the total redox state of plastoquinone in chloroplasts, the size of the photochemically active plastoquinone-pool and its redox state thylakoids of *Arabidopsis* (2006) *BBA* 1757:1669-1675.
- Kruk J., Myśliwa-Kurziel B., Jemioła-Rzemińska M., Strzałka K., Fluorescence lifetimes study of  $\alpha$ -tocopherol and biological prenylquinols in organic solvents and model membranes (2006) *Photochem Photobiol* 82:1309-1314.

## 7. Literatura

---

- Kruk J., Physiochemical properties of charge-transfer complexes of plastoquinone and  $\alpha$ -tocopherol quinone, and their possible role *in vivo* (1988a) *Biophys Chem* 32:51-56.
- Kruk J., Schmid G.H., Strzałka K., Antioxidant properties of plastoquinol and other biological prenylquinonols in liposomes and solution (1994) *Free Radical Res* 21:409-416.
- Kruk J., Schmid G.H., Strzałka K., Interaction of alpha-tocopherol quinone and alpha-tocopherol and other prenyllipids with photosystem II (2000) *Plant Physiol Biochem* 38:271-277.
- Kruk J., Strzałka K., Funkcja i mechanizm działania plastochinonu (1995b) *Post Biol Kom* 22(supl.5):89-98.
- Kruk J., Strzałka K., Identyfikacja of plastoquinone-C<sub>n</sub> w spinach i malpe leaves by reverse-phase high-performance liquid chromatography (1998) *Phytochemistry* 49:2267-2271.
- Kruk J., Strzałka K., Leblanc R. M., Fluorescence properties of plastoquinol,  $\alpha$ -tocopherol quinol and ubiquinol (1993) *J Photochem Photobiol* 19:33-38.
- Kruk J., Strzałka K., Leblanc R.M., Monolayer study of plastoquinones,  $\alpha$ -tocopherolquinone, their hydroquinone forms and their interaction with monogalactosyldiacylglycerol. Charge-transfer complexes in a mixed monolayer (1992) *Biochim Biophys Acta* 1112:19-26.
- Kruk J., Strzałka K., Leblanc R.M., Monolayer study of plastoquinones,  $\alpha$ -tocopherolquinone, their hydroquinone forms and their interaction with monogalactosyldiacylglycerol. Charge-transfer complexes in a mixed monolayer (1992) *Biochim Biophys Acta* 1112:19-26.
- Kruk J., Strzałka K., Occurrence and function of  $\alpha$ -tocopherol quinone in plants (1995a) *J Plant Physiol* 145:405-409.
- Kruk J., Szymańska R., Krupinska K., Tocopherol quinone content of green algae and higher plants revised by a new high-sensitive fluorescence detection method using HPLC - effects of high-light stress and senescence (2008) *J Plant Physiol* 165:1238-1247.
- Kruk J., Trebst A., Plastoquinol as a singlet oxygen scavenger in photosystem II (2008) *BBA* 1777:154-162.
- Kumar R., Raclaru M., Schüßeler T., Gruber J., Sadre R., Lühs W., Zarhloul K.M., Friedt W., Enders D., Frentzen M., Weier D., Characterisation of plant tocopherol cyclases and their overexpression in transgenic *Brassica napus* seeds (2005) *Febs Lett* 579:1357-1364.
- Laloi C., Apel K., Danon A., Reactive oxygen signaling: the latest news (2004) *Curr Opin Plant Biol* 7:323-328.
- Ledford H.K., Niyogi K.K., Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae (2005) *Plant Cell Environ* 28:1037-1045.
- Lee K.P., Kim C., Ladgraf F., Apel K., EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana* (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104:672-677.
- Lentz B.R., Membrane "fluidity" as detected by diphenylhexatriene probes (1989) *Chemistry and Physics of Lipids* 50:171-190.
- Lichtenthaler H.K., Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids,  $\alpha$ -tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance (2007) *Photosynth Res* 92:163-179.
- Lichtenthaler H.K., Chlorophylls and Carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes (1987) *Meth Enzymol* 148 350-382.
- Maciejewska U., Polakowska-Kowalczyk L., Swiezewska E., Szkopinska A., Plastoquinone: possible involvement in plant disease resistance (2002) *Acta Biochim Pol* 49:775-780.

## 7. Literatura

---

- Maroz A., Anderson R.F., Smith R.A.J., Murphy M.P., Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: implications for *in vivo* antioxidant activity (2009) *Free Radical Bio Med* 46:105-109.
- Matthäus B., Vosmann K., Pham L.Q., Aitzetmüller K., FA and Tocopherols Composition of Vietnamese Oilseeds (2003) *J Am Oil Chem Soc* 80:1013-1020.
- Mène-Saffrané L., DellaPenna D., Biosynthesis, regulation and functions of tocopherols in plants (2009) *Plant Physiol Biochem – w druku*.
- Millner P.A., Barber J., Plastoquinone as a mobile carrier in the photosynthetic membrane (1984) *FEBS Lett* 169:1-6.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F., Reactive oxygen species gene network of plants (2004) *Trends Plant Sci* 9:490-498.
- Miyamoto S., Ronsein G.E., Prado F.M., Uemi M., Corrêa T.C., Toma I.N., Bertolucci A., Oliveira M.C.B., Motta F.D., Medeiros M.H.G., Di Mascio P., Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation (2007) *IUBMB Life* 59:322-331.
- Möller I.M., Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species (2001) *Annu Rev Physiol Plant Mol Biol* 52:561-91.
- Mukai K., Daifuku K., Okabe K., Tanigaki T., Inoue K., Structure- activity relationship in the quenching reaction of singlet oxygen by tocopherol (vitamin E) derivatives and related phenols. Finding of linear correlation between the rates of quenching of singlet oxygen and scavenging of peroxy radicals in solution (1991) *J Org Chem* 56:4188-4192.
- Mukai K., Itoh S., Daifuku K., Morimoto H., Inoue K., Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by biological prenylquinols in liposomes and solution (1993a) *Free Radical Res* 1183:323-326.
- Mukai K., Itoh S., Morimoto H., Stopped-flow kinetic-study of vitamin E regeneration reaction with biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K and tocopherolquinone) in solution (1992) *J Biol Chem* 267:22277-22281.
- Mukai K., Morimoto H., Kikuchi S., Nagaoka S., Kinetic study of free-radical-scavenging action of biological hydroquinones (reduced form of ubiquinone, vitamin K and tocopherol quinone) in solution (1993b) *Biochim Biophys Acta* 1157:313-317.
- Munné-Bosch S., Alegre L., The function of tocopherols and tocotrienols in plants (2002) *Crit Rev Plant Sci* 21:31-57.
- Munné-Bosch S., Falk J., New insights into the function of tocopherols in plants (2004) *Planta* 218:323-326
- Munné-Bosch S., Shikanai T., Asada K., Enhanced ferredoxin-dependent cyclic electron flow around photosystem I and  $\alpha$ -tocopherol quinone accumulation in waterstressed *ndhB*-inactivated tobacco mutants (2005) *Planta* 222:502-11.
- Munné-Bosch S., The role of  $\alpha$ -tocopherol in plant stress tolerance (2005) *J Plant Physiol* 162:743-748.
- Munné-Bosch S., Weiler E.W., Alegre L., Müller M., Dücking P., Falk J.,  $\alpha$ -Tocopherol may influence cellular signaling by modulating jasmonic acid levels in plants (2007) *Planta* 225:681-691.
- Muralikrishnan D., Jun R., The emerging role of coenzyme Q-10 in aging, neurodegeneration, cardiovascular disease, cancer and diabetes mellitus (2005) *Cur Neurovascular Res* 2:447-459.
- Navrot N., Rouhier N., Gelhaye E., Jacquot J.-P., Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria (2007) *Physiol Plantarum* 129:185-195.



## 7. Literatura

---

- Neely W.C., Martin J.M., Barker S.A., Products and relative reaction rates of the oxidation of tocopherols with singlet molecular oxygen (1988) *Photochem Photobiol* 48:423-428.
- Niki E., Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects (2009) *Free Radical Biol Med* 47:469-484.
- Niki E., Noguchi N., Dynamics of antioxidant action of vitamin E (2004) *Acc Chem Res* 37:45-51.
- Niki E., Tocopherylquinone and tocopherylhydroquinone (2007) *Redox Rep* 12:204-210.
- Noguchi N., Hanyu R., Nonaka A., Okimoto Y., Kodama T., Inhibition of THP-1 cell adhesion to endothelial cells by  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol is dependent on intracellular concentration of the antioxidants (2003) *Free Radical Biol Med* 34:1614-1620.
- Nohl H., Staniek K., Kozlov A.V., Gille L., The biomolecule ubiquinone exerts a variety of biological functions (2003) *Biofactors* 18:23-31.
- Norris S.R., Barrette T.R., DellaPenna D., Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation (1995) *Plant Cell* 7:2139-2149.
- Nowicka B., Szymańska R., Kruk J., Chinony prenylowe – występowanie, biosynteza i funkcje (2009) *Post Bioch* 55:307-314.
- Nyathi Y., Baker A., Plant peroxisomes as a source of signalling molecules (2006) *BBA* 1763:1478-1495.
- Olejnik D., Gogolewski M., Nogala-Kałużka M., Isolation and some properties of plastochromanol-8 (1997) *Nahrung* 41:101-104.
- Ong A.S.H., Natural sources of tocotrienols (1993) *Vitamin E in Health and Disease* (Packer L. i Fuchs J.) Marcel Dekker, Inc., New York, NY strony 3-8.
- Overmyer K., Brosché M., Kangasjärvi J., Reactive oxygen species and hormonal control of cell death (2003) *Trends Plant Sci* 8:335-342.
- Packer L., Weber S.U., Rimbach G., Molecular aspects of  $\alpha$ -tocotrienol antioxidant action and cell signalling (2001) *J Nutr* 131:369S-373S.
- Pfannschmidt T., Nilsson A., Allen J.F., Photosynthetic control of chloroplast gene expression (1999) *Nature* 379:625-628.
- Pospíšil P., Production of reactive oxygen species by photosystem II (2009) *BBA* 1787:1151-1160.
- Pshybytko N.L., Kruk J., Kabashnikova L.F., Strzałka K., Function of plastoquinone in heat stress reactions of plants (2008) *BBA* 1777:1393-1399.
- Redmond R.W., Kochevar I.E., Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen (2006) *Photochem Photobiol* 82:1178-1186.
- Rhoads D.M., Umbach A.L., Subbaiah C.C., Siedow J.N., Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling (2006) *Plant Physiol* 141:357-366.
- Rimbach G., Minihane A. M., Majewicz J., Fischer A., Pallauf J., Virgli F., Weinberg P. D., Regulation of cell signaling by vitamin E (2002) *P Nutr Soc* 61:415-425.
- Sang M., Ma F., Xie J., Chen X-B., Wang K-B., Qin X-C., Wang W-D., Zhao J-Q., Li L-B., Zhang J-P., Kuang T-Y., High-light induced singlet oxygen formation in cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex from *Bryopsis corticulans* as detected by EPR spectroscopy (2010) *Biophys Chem* 146:7-12.
- Schneider C., Chemistry and biology of vitamin E (2005) *Mol Nutr Fod Res* 49:7-30.
- Schrader M., Fahimi H.D., Peroxisomes and oxidative stress (2006) *BBA* 1763:1755-1766.

## 7. Literatura

---

- Sen C.K., Khanna S., Roy S., Packer L., Molecular basis of vitamin E action. Tocotrienol potently inhibits glutamate-induced pp60<sup>c-Src</sup> kinase activation and death of HT4 neuronal cells (2000) *J Biol Chem* 275:13049-13055.
- Sen K.C., Khanna S., Roy S., Tocotrienol: the natural vitamin E to defend the nervous system? (2004) *Ann N Y Acad Sci* 1031:127-142.
- Sen K.C., Khanna S., Roy S., Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family (2007) *Mol Aspects Med* 28:692-728.
- Sen K.C., Khanna S., Roy S., Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols (2006) *Life Sci* 78:2088-2098.
- Shi H.L., Noguchi N., Niki E., Comparative study on dynamics of antioxidative action of  $\alpha$ -tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and  $\alpha$ -tocopherol against lipid peroxidation (1999) *Free Radical Bio Med* 27:334-346.
- Siegel D., Bolton E.M., Burr J.A., Liebler D.C., Ross D., The reduction of  $\alpha$ -tocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of  $\alpha$ -tocopherolhydroquinone as cellular antioxidant (1997) *Mol Pharmacol* 52:300-305.
- Siemieniuk E., Skrzydlewska E., Koenzym Q-10 – biosynteza i znaczenie biologiczne w organizmach zwierząt i człowieka (2005) *Postępy Hig Med Dośw* 59:150-159.
- Soballe B., Poole R.K., Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management (1999) *Microbiology* 145:1817-1830.
- Song Y-G., Liu B., Wang L.F., Li M.H., Liu Y., Damage to the oxygen-evolving complex by superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical in photoinhibition of photosystem II (2006) *Photosynth Res* 90:67-78.
- Strzałka K., Szymańska R., Świeżewska E., Skorupińska-Tudek K., Suwalsky M., Tocochromanols, plastoquinone and polyprenols in selected plant species from Chilean Patagonia (2009) *Acta Biol Cracov Bot* 51/1:39-44.
- Szymańska R., Kruk J., Identification of hydroxy-plastochromanol in *Arabidopsis* leaves (2010b) *Acta Biochim Pol* 57:105-108.
- Szymańska R., Kruk J., Plastochromanol, a 'new' lipophilic antioxidant is synthesized by tocopherol cyclase in *Arabidopsis* leaves: the effect of high-light stress on the level of prenyllipid antioxidants (2008c) *w Photosynthesis: energy from the sun: 1581-1584.*
- Szymańska R., Kruk J., Plastochinol is the main prenyllipid synthesized during acclimation to High Light conditions in *Arabidopsis* and is converted to plastochromanol by tocopherol cyclase (2010a) *Plant Cell Physiol* 51:537-545.
- Szymańska R., Kruk J., Tocopherol content and isomers' composition in selected plant species (2008a) *Plant Physiol Biochem* 46:29-33.
- Szymańska R., Kruk J.,  $\gamma$ -Tocopherol dominates in young leaves of runner bean (*Phaseolus coccineus*) under a variety of growing conditions: the possible functions of  $\gamma$ -tocopherol (2008b) *Phytochemistry* 69:2142-2148.
- Świeżewska E., Dallner G., Andersson B., Ernster L., Biosynthesis of ubiquinone and plastoquinone in the endoplasmic reticulum-Golgi membranes of spinach leaves (1993) *J Biol Chem* 268:1494-1499.
- Theriault A., Chao J.-T., Wang Q., Gapor A., Adeli K., Tocotrienol: a review of its therapeutic potencial (1999) *Clin Biochem* 32:309-319.

## 7. Literatura

---

- Thies W., Entwicklung von Ausgangsmaterial mit erhöhten  $\alpha$ - oder  $\gamma$ -Tocopherol-Gehalten im Samenöl für die Körnerraps-Züchtung (1997) *Angew. Bot* 7:62-67.
- Trebst A., Depka B., Holländer-Czytko H., A specific role for tocopherol and chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii* (2002) *FEBS Lett* 516:156-160.
- Triantaphylides C., Havaux M., Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signalling (2009) *Trends Plant Sci* 14:219-228.
- Triantaphylides C., Krischke M., Hoerberichts F.A., Ksas B., Gresser G., Havaux M., Van Breusegem F., Mueller M.J., Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage in plants (2008) *Plant Physiol* 148:960-968.
- Turunen M., Olsson J., Dallner G., Metabolism and function of coenzyme Q (2004) *BBA* 1660:171-199.
- Van der Kooij T.A.W., Krupińska K., Krause K., Tocochromanol content and composition in different species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta* (2005) *J Plant Physiol* 162:777-781.
- Vass I., Cser K., Cheregi O., Molecular mechanism of light stress of photosynthesis (2007) *Ann N Y Acad Sci* 1113:114-122.
- Velasco L., Goffman F.D., Tocopherol, plastochromanol and fatty acid patterns in the genus *Linum* (2000) *Plant Syst Evol* 221:77-88.
- Wagner D., Przybyla D., op den Camp R., Kim C., Landgraf F., Lee K.P., Würsch M., Laloi C., Nater M., Hideg E., Apel K., The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana* (2004) *Science* 306:1183-1185.
- Whittle K.J., Dunphy P.J., Pennock J.F., Plastochromanol in the Leaves of *Hevea brasiliensis* (1965) *Biochem J* 96:17c-19c.
- Yamashita N., Murata M., Inoue S., Burkitt M.J., Milne L., Kawanishi S., Alpha-tocopherol induces oxidative damage to DNA in the presence of copper(II) ions (1998) *Chem Res Toxicol* 11:855-862.
- Yamauchi R., Matsushita S., Products formed by photosensitized oxidation of tocopherols (1979) *Agric Biol Chem* 43:2151-2156.
- Yamauchi R., Yagi Y., Kato K., Oxidation of alpha-tocopherol during the peroxidation of dilinoleoylphosphatidylcholine in liposomes (1996) *Biochim Biophys Acta* 60:616-620.
- Yoshida Y., Niki E., Noguchi N., Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects (2003) *Chem Phys Lipids* 123:63-75.
- Yoshida Y., Saito Y., Jones L.S., Shigeri Y., Chemical reactivities and physical effects in comparison between tocopherols and tocotrienols: physiological significance and prospects as antioxidants (2007) *J Biosci Bioeng* 104:439-445.
- Zingg J-M., Modulation of signal transduction by vitamin E (2007) *Mol Aspects Med* 28:481-506.
- Zubr J., Matthäus B., Effects of growth conditions on fatty acid and tocopherols in *Camelina sativa* oil (2002) *Ind Crop Prod* 15:155-162.
- (łącznie 193 pozycje)**

## Errata

Strona 22, Tabela.1. powinno być:

nazwa	symbol
<b>RODNIKOWE POCHODNE TLENU</b>	
rodnik hydroksylowy (ang. <i>hydroxyl radical</i> )	$\cdot\text{OH}$
anionrodnik podantlenkowy (ang. <i>superoxide radical anion</i> )	$\text{O}_2^{\cdot-}$
rodnik wodoronadtlenkowy (ang. <i>hyroperoxyl radical</i> )	$\text{HO}_2^{\cdot-}$
rodnik nadtlenkowy (ang. <i>peroxyl radical</i> )	$\text{ROO}^{\cdot}$
rodnik alkoksylowy (ang. <i>alkoxyl radical</i> )	$\text{RO}^{\cdot}$
<b>NIERODNIKOWE POCHODNE TLENU</b>	
nadtlenek wodoru (ang. <i>hydrogen peroxide</i> )	$\text{H}_2\text{O}_2$
tlen singletowy (ang. <i>singlet oxygen</i> )	$^1\Delta_g\text{O}_2$
tlen singletowy (ang. <i>singlet oxygen</i> )	$^1\Sigma_g^+\text{O}_2$

Strona 23, należało usunąć zdanie: Należy podkreślić, że w odróżnieniu od krótkożyjącego stanu singletowego  $^1\Sigma_g^+$ , stan  $^1\Delta_g$  nie jest rodnikiem, gdyż nie posiada niesparowanych elektronów (Rys. 9).