

Received: 2004.09.29
 Accepted: 2005.02.03
 Published: 2005.02.21

Niskocząsteczkowe związki przeciwutleniające pochodzenia naturalnego

Low-molecular antioxidant compounds of natural origin

Zbigniew Sroka¹, Andrzej Gamian², Wojciech Cisowski¹

¹ Katedra i Zakład Farmakognozji, Akademii Medycznej we Wrocławiu

² Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, im. L. Hirsfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Witaminy C, E, karotenoidy i związki fenolowe pochodzące z roślin są niskocząsteczkowymi substancjami należącymi do związków wykazujących dużą aktywność przeciwutleniającą i przeciw-wolnorodnikową. Procesy wolnorodnikowe mają bardzo złożony przebieg. Na podstawie badań danego związku przeprowadzonych w warunkach *in vitro* nie można wnioskować o aktywności tego związku w warunkach *in vivo*.

W pracy opisano przeciwutleniającą i przeciwvolnorodnikową aktywność w warunkach *in vitro* i *in vivo* niektórych przeciwutleniaczy dostarczanych w pożywieniu, głównie pochodzenia roślinnego oraz omówiono możliwość ich aktywności prooksydacyjnej.

Słowa kluczowe:

witaminy C i E • karotenoidy • fenole roślinne • przeciwutleniacze

Summary

Vitamins C, and E, carotenoids, and phenolic compounds from plants are low-molecular substances which express strong antioxidant and antiradical activity. Free radical processes are very complicated way, and it is impossible to draw conclusions from *in vitro* analysis of any compound regarding the role it would play under *in vivo* conditions.

In this study, the *in vivo* and *in vitro* antioxidant and antiradical activities of some antioxidants contained in vegetable foods as well as the possibility of their prooxidant activity are described.

Key words:

vitamins C and E • carotenoids • plant phenolics • antioxidants

Full-text PDF:

http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7041.pdf

Word count:

3350

Tables:

–

Figures:

4

References:

78

Adres autora:

dr Zbigniew Sroka, Katedra i Zakład Farmakognozji AM, ul. Nankiera 1, 50-140 Wrocław;
 e-mail: zbsroka@bf.uni.wroc.pl



WSTĘP

Przeciwutleniające związki niskocząsteczkowe o znanej budowie i określonych właściwościach fizyko-chemicznych mają często lepiej określoną aktywność biologiczną niż związki wysokocząsteczkowe o złożonej budowie, jak na przykład garbniki. Z powodu prostej budowy niskocząsteczkowe przeciwutleniacze mogą także stanowić dogodne modele do badania i wyjaśniania procesów wygaszania wolnych rodników. Intensywne badania procesów wolnorodnikowych prowadzone od wielu lat sprawiają znaczący postęp wiedzy w tym zakresie. Powoduje to coraz lepsze rozumienie zjawisk wolnorodnikowych i jednocześnie dostrzeganie znacznego stopnia złożoności tych procesów.

Badania ostatnich lat wskazują, że związki uważane za przeciwutleniacze, w pewnych warunkach jakie mogą powstać *in vivo*, wykazują aktywność prooksydacyjną, stylując procesy wolnorodnikowe.

W niniejszym opracowaniu podjęto dyskusję nad aktywnością antyoksydacyjną i prooksydacyjną znanych przeciwutleniaczy pochodzenia naturalnego, takich jak witamina C, tokoferole, karotenoidy i fenole roślinne. Niektóre reakcje przeprowadzone w warunkach *in vitro* wskazują bowiem na możliwość prooksydacyjnego działania tych związków w organizmach ludzi i zwierząt.

Celem niniejszego opracowania jest wskazanie, oprócz przeciwwolnorodnikowych i antyoksydacyjnych aktywności, także w określonych warunkach prooksydacyjnych właściwości prostych przeciwutleniaczy dostarczanych w pożywieniu, takich jak witaminy C i E, karoteniny i fenole roślinne.

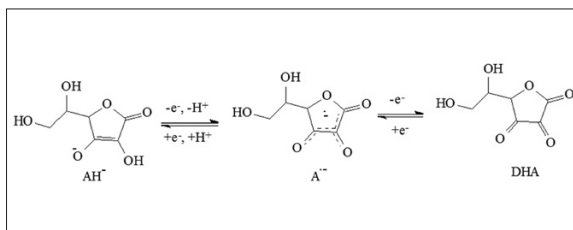
WITAMINA C (KWAS ASKORBINOWY)

Witamina C w warunkach fizjologicznych występuje w postaci częściowo zjonizowanej, więc w dalszej części pracy będzie używana nazwa askorbinian, zamiennie z nazwą witamina C (ryc. 1). Rośliny i większość zwierząt mają zdolność syntezy witaminy C. Świnki morskie, nieperze, ludzie i inne naczelną należą do tych organizmów, które muszą otrzymywać witaminę C w pożywieniu, gdyż utraciły enzym oksydazę glukonolaktonową, biorącą udział w końcowej fazie biosyntezy witaminy C, w której następuje przemiana L-glukono- γ -laktonu w L-askorbinian.

Ważną właściwością askorbinianu mającą duże znaczenie biologiczne jest jego aktywność redukująca. Askorbinian redukuje jony żelaza Fe (III) do Fe (II), co z kolei ma istotne znaczenie w pobieraniu żelaza, ponieważ ten pierwiastek jest absorbowany w dwunastnicy w postaci zredukowanej Fe (II).

Zaobserwowano, że askorbinian hamuje rakotwórczą aktywność związków nitrozowych, takich jak N-nitrozoaminy (np. dimetylonitrozoamina) [43,71], co może być następstwem redukcji tych związków do postaci nieaktywnych.

Askorbinian jest konieczny do utrzymania postaci zredukowanej żelaza i innych metali, wchodzących w skład niektórych enzymów hydrolitycznych.

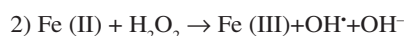


Ryc. 1. Utlenianie askorbinianu (AH⁻) do rodnika askorbylowego (A[•]) i dehydroaskorbinianu (DHA) [21]

W wyniku oddania elektronu (ryc. 1) askorbinian (AH⁻) przechodzi w postać rodnikową A[•] (rodnik askorbylowy), który może być w dalszym ciągu utleniany do dehydroaskorbinianu (DHA).

Rodniki o dużej aktywności reagują z askorbinianem, w wyniku czego powstaje znacznie mniej reaktywny rodnik askorbylowy. Dehydroaskorbinian jest natomiast związkiem niestabilnym i rozpada się do kwasu szczawowego i kwasu treozowego.

Askorbinian jest związkiem stabilnym w roztworach wodnych o pH 7,4, jeśli w środowisku nie ma jonów metali przejściowych, które katalizują szybkie utlenianie askorbinianu. W wyniku duwetapowej reakcji utlenienia askorbinianu np. w obecności jonów Cu (II) lub Fe (III) (przykład poniżej) powstają zredukowane jony metali, które następnie reagują z H₂O₂ dając bardzo niebezpieczny dla zdrowia rodnik OH[•]

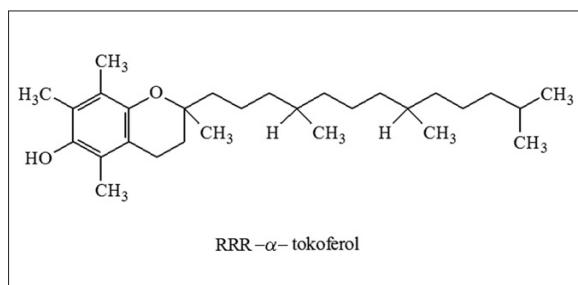


Zaobserwowano, że askorbinian może w pewnych warunkach niszczyć komórki zwierzęce, w tym komórki nowotworowe [12,34]. Niszcząca aktywność witaminy C jest prawdopodobnie związana z powstawaniem reaktywnych form tlenu w obecności śladowych ilości jonów metali przejściowych. Mieszanina askorbinianu z jonami metali przejściowych ma zdolność inaktywacji wielu białek [5,14,63], co prawdopodobnie jest związane z wytwarzaniem rodnika OH[•]. Mieszanina jonów żelazowych i askorbinianu jest używana w warunkach laboratoryjnych od dawna w celu indukowania powstawania rodnika OH[•] [22].

W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że askorbinian ma właściwości przeciwutleniające, zabezpieczające cząsteczki o ważnych dla organizmu właściwościach biologicznych, takich jak błony biologiczne oraz frakcje lipidowe krwi (LDL), przed zniszczeniem przez reaktywne formy tlenu lub azotu [6,56].

Działanie przeciwutleniające askorbinianu *in vivo* nie jest wystarczająco udowodnione. Wiemy, że witamina C jest niezbędna w diecie człowieka, a jej niedobór powoduje powstawanie skorbutu. Prawdopodobnie askorbinian pośrednio uczestniczy w syntezie kolagenu poprzez wpływ na aktywność hydroksylazy prolinowej i lizynowej [49,50].

Przypuszcza się, że askorbinian uczestniczy w redukcji utlenionej postaci witaminy E (ryc. 2), jednak mimo prze-



Ryc. 2. Wzór najbardziej aktywnej biologicznie postaci witaminy E, czyli RRR- α -tokoferolu (inna nazwa d- α -tokoferolu)

przewodzenia wielu badań, nie udowodniono jednoznacznie powyższej hipotezy. Nie wykazano nawet czy askorbinian w ogóle uczestniczy w przemianach witaminy E. Chociaż niewiele wiadomo na temat ewentualnej ochronnej roli witaminy C jako przeciwutleniaacza w warunkach *in vivo*, pewne badania wskazują jednak, że askorbinian może pełnić taką rolę. Zaobserwowano np. wzrost oksydacyjnego niszczenia DNA spermy mężczyzn narażonych na znaczne niedobory witaminy C, podczas gdy stan ten uległ normalizacji po podaniu askorbinianu [16,18]. Askorbinian również obniżał oksydacyjne niszczenie DNA w limfocytach palaczy tytoniu [61].

Dalszych szczegółów dotyczących przeciwutleniającej roli askorbinianu *in vivo* dostarczają badania, w których zaobserwowano obniżenie stężenia askorbinianu w warunkach stresu oksydacyjnego. Obserwuje się np. intensywne utlenianie askorbinianu do DHA w płynie maziowym w stawach chorych na reumatoidalne zapalenie stawów [38]. Przymuszcza silne utlenianie askorbinianu jest spowodowane eliminowaniem reaktywnych form tlenu i azotu pochodzących od aktywowanych fagocytów. Zawartość DHA w porównaniu z postacią zredukowaną askorbinianu jest bardzo mała u ludzi zdrowych. Stosunek ten zmienia się w przypadku takich chorób, jak np. reumatoidalne zapalenie stawów [38] i cukrzyca, gdzie obserwuje się wzrost stężenia DHA w osoczu [62].

Utlenianie askorbinianu przez reaktywne formy tlenu i azotu prowadzi do jego ubywania. Najpierw powstaje rodnik askorbylowy. Z rodnika askorbylowego, w wyniku reakcji dysproporcjonowania powstaje zredukowany askorbinian oraz dehydroaskorbinian. Dehydroaskorbinian ulega nieenzymatycznemu rozpadowi do szczawianu i innych produktów utlenienia. Dehydroaskorbinian może ulegać szybkiej konwersji do postaci aktywnej w komórkach, takich jak eryocyty, neutrofile i prawdopodobnie także w innych typach komórek. W wielu tkankach enzymy mogą dokonywać konwersji rodników askorbylowych lub DHA do askorbinianu z wykorzystaniem puli glutationu (GSH) i dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADH) [41,42].

Witamina C, jak już wspomniano, może wykazywać również działanie prooksydacyjne i stymulujące powstawanie wolnych rodników. Dzieje się tak np. w mieszaninie reakcyjnej, w której obok askorbinianu znajduje się H_2O_2 i kompleks żelazo-EDTA. Powstają wtedy bardzo reaktywne rodniki hydroksyloxy. Proces powstawania rodników hydroksyloxy w obecności żelaza podano wcześniej. Podobna reakcja tworzenia rodnika hydroksyloxygo

przez askorbinian przebiega w obecności jonów miedzi Cu (II). Mieszanki miedzi i żelaza z askorbinianem, niszczą *in vitro* DNA, tłuszcze i białka, poprzez stymulowanie powstawania rodnika hydroksyloxygo. Podobny proces obserwuje się w warunkach *in vivo*. Podanie zwierzętom dużych ilości askorbinianu z jonami żelaza lub miedzi stymuluje procesy degeneracyjne, które są prawdopodobnie wynikiem powstawania rodników OH^\bullet [10]. Podobnie, podczas rozpuszczania preparatów witaminowych zawierających jony metali i witaminę C powstają rodniki OH^\bullet . Mieszanka askorbinianu i jonów miedziowych poprzez generowanie rodników OH^\bullet szybko inaktywuje różne enzymy np. katalazę. Ważnym zagadnieniem jest, czy opisana wyżej aktywność stymulująca powstawanie wolnych rodników oraz prooksydacyjna aktywność askorbinianu ma duże znaczenie fizjologiczne. Wiedza na ten temat pozwoliłaby bowiem ustalić optymalny poziom askorbinianu w diecie. Nie ma przekonujących dowodów na to, że duże dawki witaminy C działają toksycznie u ludzi zdrowych, mimo to uważa się obecnie, że nie należy stosować wielogramowych dawek dziennych askorbinianu. Askorbinian ulega resorpcji w nerkach, a jego zużycie jest stosunkowo małe tak, że dawka dobowo 200 mg jest całkowicie wystarczająca do nasycenia komórek i płynów ustrojowych człowieka tym związkiem. Nadmiar witaminy C jest po prostu wydalany.

Powstawanie wolnych rodników w obecności jonów metali przejściowych, opisane powyżej, zostało wykazane również dla mieszanin jonów metali, z takimi czynnikami redukującymi jak witamina E, GSH, NAD(P)H oraz związki fenolowe pochodzenia roślinnego [15,32,35]. W związku z tym, ważnym zagadnieniem jest dostępność w organizmie metali przejściowych takich jak żelazo. Jony żelaza są ważne dla zdrowia człowieka, a szczególnie dzieci i kobiet w ciąży, lecz nadmiar żelaza może być szkodliwy.

W warunkach *in vivo* żelazo i jony miedziowe są przeważnie wiązane przez różne czynniki do postaci nieaktywnych, niezdolnych do katalizowania reakcji wolnorodnikowych. Jednak w komórkach znajduje się pewna pula żelaza (możliwe, że również miedzi), która w kontakcie z askorbinianem może działać prooksydacyjnie.

WITAMINA E (D- α -TOKOFEROL)

Witamina E jest zmiataczem rodników ponadtlenujących, jest prawdopodobnie najważniejszym, choć nie jedynym, inhibitorem łańcuchowej reakcji wolnorodnikowej przebiegającej podczas utleniania (peroksydacji) lipidów.

Brak witaminy E w diecie zwierząt powodował sterylność osobników męskich różnych gatunków zwierząt [8], powodował również zmiany degeneracyjne w mózgu kurcząt [20]. Krótkookresowy brak witaminy E w diecie dorosłego człowieka nie powoduje żadnych objawów chorobowych. Małe stężenie tej witaminy u przedwcześnie narodzonych dzieci może predestynować do anemii hemolitycznej, prawdopodobnie z powodu zwiększenia kruchości błon erytrocytów.

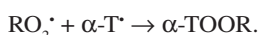
Wykryto osiem naturalnie występujących związków mających aktywność witaminy E: d- α -, d- β -, d- γ -, d- δ -tokoferole i d- α -, d- β -, d- γ -, d- δ -tokotrienole. Najbardziej biologicznie



aktywną postacią jest d- α -tokoferol, obecnie częściej zwany RRR- α -tokoferolem (ryc. 2). Postaci takie jak β -, γ - i δ -tokoferole okazały się mniej ważne jako przeciwutleniacze dla człowieka niż α -tokoferol, chociaż wszystkie wykazują aktywność przeciwutleniającą. Tokoferole i tokotrienole szczególnie skutecznie hamują peroksydację lipidów głównie dlatego, że eliminują z dużą skutecznością rodniki peroksydacyjne (RO_2^*) zanim te zdążą uszkodzić cząsteczki kwasów tłuszczowych lub białka błonowe. Reakcja wygaszania rodników peroksydacyjnych przebiega następująco:



Tokoferole wygaszają również tlen singletowy i w ten sposób zabezpieczają dodatkowo błony komórkowe przed procesem peroksydacji. W wyniku reakcji α -tokoferolu z anionrodnikiem ponadtlenkowym $O_2^{\cdot-}$ lub rodnikiem OH^* powstaje rodnik $\alpha\text{-T}^*$, który następnie może reagować z rodnikami nadtlenkowymi dając produkty niebędące rodnikami:



W ten sposób jedna cząsteczka tokoferolu jest zdolna wyeliminować dwa wolne rodniki.

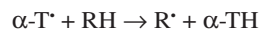
α -tokoferol w dużych stężeniach działa stabilizująco na błony biologiczne [17,73], a także wykazuje inne działania niebędące następstwem jego aktywności przeciwutleniającej, np. zmniejsza agregację płytek krwi [19,65]. Eliminacja rodników ponadtlenkowych i aktywność przeciwutleniająca jest prawdopodobnie główną fizjologiczną funkcją α -tokoferolu.

α -tokoferol jest cząsteczką rozpuszczalną w tłuszczach, dlatego jest umiejscowiony przede wszystkim we wnętrzu błon komórkowych i w lipoproteinach. Hydrofobowy ogon α -tokoferolu znajduje się w błonie, podczas gdy pierścień chromanolu zawierający grupy OH ulokowany jest na powierzchni błony kontaktując się z zewnętrznym środowiskiem wodnym. Za reakcję z rodnikami odpowiedzialna jest grupa OH połączona z aromatycznym pierścieniem chromanolu.

α -tokoferol działając jako przeciwutleniacz lub zmiatacz wolnych rodników przechodzi w postać rodnikową ($\alpha\text{-T}^*$), która może zostać zredukowana ponownie do α -tokoferolu w reakcji z substancjami, takimi jak glutation i witamina C. W literaturze spotyka się doniesienia o istnieniu synergizmu między α -tokoferolem i askorbinianem [11] oraz prace, które nie potwierdzają udziału askorbinianu w regeneracji rodnikowej postaci tokoferolu ($\alpha\text{-T}^*$) [76].

Inną przemianą rodników witaminy E jest konwersja tych rodników do α -tokoferyllochinonu i innych produktów, które są wydalane z moczem.

Tokoferole wykazują również pewne właściwości prooksydacyjne w układach *in vitro*. Podobnie jak witamina C podczas redukcji Fe (III) do Fe (II) i Cu (II) do Cu (I), tokoferole stymulują powstawanie rodników OH^* . Poza tym rodnik $\alpha\text{-T}^*$ poprzez stosunkowo wolną reakcję jest zdolny oderwać wodór z cząsteczki wielonienasyconego kwasu tłuszczowego



i w ten sposób działa jako słaby promotor utleniania tłuszczów bogatych w nienasycone kwasy tłuszczowe.

Objawy wynikające z niedoboru witaminy E u zwierząt łągodzi się podając naturalne i syntetyczne przeciwutleniacze lub podwyższając w diecie zawartość seleniu [52,69]. Podawanie zwierzętom dużych ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych powoduje wzrost zapotrzebowania na witaminę E. Zaobserwowano, że karmienie zwierząt hodowlanych tłuszczami zawierającymi dużo nienasyconych kwasów tłuszczowych zmniejsza odporność ich mięsa na degradację. Podawanie w diecie zwierzętom witaminy E znacznie zwiększa odporność mięsa uzyskanego z tych zwierząt na procesy peroksydacyjne [60].

Szczury z niedoborem witaminy E wydychają więcej gazowych węglowodorów niż szczury, otrzymujące w diecie prawidłową ilość tej witaminy. Efekt ten jest szczególnie widoczny gdy szczury są karmione pokarmem o większej zawartości niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), co świadczy o intensywniejszym procesie utleniania lipidów.

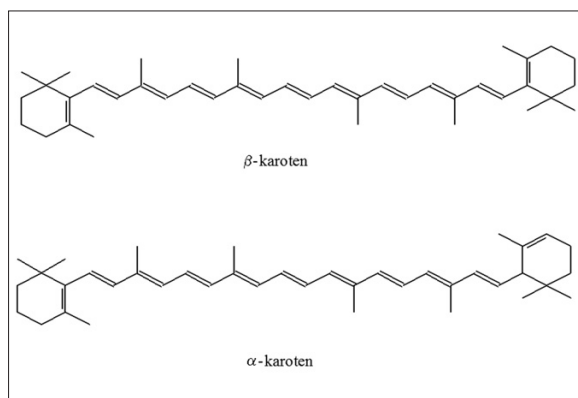
Stosując kwas tiobarbiturowy (kwas tiobarbiturowy tworzy połączenia kompleksowe z produktami utleniania tłuszczów, które następnie oznacza się kolorymetrycznie przy długości fali 535 nm), stwierdzono wysoki poziom produktów utleniania lipidów u szczurów karmionych dietą o mniejszej zawartości witaminy E, a z większą zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [33]. Brak witaminy E w diecie szczurów wzmacnia procesy starzenia się, co przejawia się zwiększoną akumulacją lipofuscyny w komórkach [44]. Karmienie owiec dietą ubogą w witaminę E spowodowało znaczny wzrost podatności erytrocytów tych zwierząt na hemolizę. Uzupełnienie diety w witaminę E spowodowało wzrost oporności erytrocytów owiec na hemolizę [66].

Znaczny niedobór α -tokoferolu u dorosłych ludzi może wystąpić z powodu zaburzeń we wchłanianiu tłuszczów w jelicie lub jako wynik wrodzonych błędów metabolizmu α -tokoferolu. Na przykład u pacjentów cierpiących na rzadką chorobę abetalipoproteinemii, z powodu nieprawidłowego metabolizmu lipidów zaburzone jest wchłanianie tłuszczów i α -tokoferolu. We krwi tych chorych stwierdza się małe stężenie α -tokoferolu, w wyniku czego dochodzi do uszkodzenia neuronów, degeneracji siatkówki, pojawiają się nieprawidłowe krwinki tzw. akantocyty. Uszkodzenia nerwów i siatkówki mogą być zahamowane przez doustne podanie dużych dawek α -tokoferolu [64].

KAROTENOIDY

Karotenoidy są grupą żółtych, czerwonych i pomarańczowych pigmentów, bardzo rozpowszechnionych w tkankach roślinnych. Karotenoidy, obok witamin E i C oraz fenoli roślinnych, należą do naturalnych przeciwutleniaczy. Nie udowodniono jednak jednoznacznie, czy związki te *in vivo* wykazują działanie przeciwutleniające. Chemiczną budowę dwóch związków reprezentujących obszerniejszą grupę karotenoidów α - i β -karotenu pokazano na ryc. 3.

Karotenoidy są hydrofobowymi związkami, nierozpuszczalnymi w wodzie. We krwi człowieka występują głównie

Ryc. 3. Wzór α - i β -karotenu

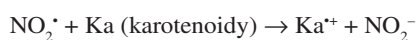
związane z lipoproteinami. Poza tym znajdują się w tkance tłuszczowej, w błonach komórkowych, mogą się również wiązać z hydrofobowymi domenami niektórych białek [9,75]. Karotenoidy są prekursorami witaminy A, koniecznej do prawidłowego wzrostu i różnicowania się komórek. Są głównym dietetycznym źródłem witaminy A dla człowieka. W przewodzie pokarmowym poddane są działaniu oksygenaz, w wyniku czego powstaje aldehyd retinal, który następnie jest redukowany do retinolu. Badania wykazały, że duże stężenie karotenoidów we krwi wpływa na zmniejszenie podatności na niektóre rodzaje nowotworów [59], m.in. na raka płuc [70,78]. Uważa się, że bezpośredni wpływ karotenoidów na zmniejszenie wzrostu nowotworów może wynikać z ułatwienia komunikacji między komórkami, co wpływa hamująco na wzrost komórek transformowanych. Właściwości przeciwnowotworowe karotenoidów nie są jak do tej pory dostatecznie udowodnione. Karotenoidy pełnią w roślinie wiele funkcji [72]. Jedną z ważniejszych fizjologicznych funkcji tych związków, dzięki ich aktywności przeciwutleniającej, jest zabezpieczenie przed powstawaniem nadmiernej ilości reaktywnych form tlenu podczas fotosyntezy (szczególnie tlenu singletowego).

Podawanie β -karotenu pacjentom chorym na porfirię ma działanie zabezpieczające przed uszkodzeniem skóry wywołanym światłem [40]. Warto wspomnieć, że światło słoneczne obniża zawartość β -karotenu w skórze zmniejszając jego ochronną rolę.

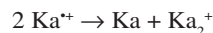
W badaniach *in vitro* wykazano, że β -karoten hamuje peroksydację lipidów przy małym stężeniu tlenu, lecz nie hamuje tego procesu gdy stężenie tlenu jest duże [47,77].

Badania wykazały, że β -karoten nie zabezpiecza dostatecznie frakcji lipidowych krwi (LDL) przed peroksydacją [27]. Karotenoidy są silnymi wygaszaczami tlenu singletowego. Tłumaczy to leczniczą skuteczność tych związków u chorych na porfirię [39], u których w wyniku naświetlania światłem słonecznym powstają zmiany na powierzchni skóry będące efektem działania tlenu singletowego.

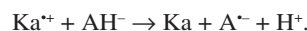
W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że karotenoidy zmiatają wolne rodniki. Na przykład rodniki utleniające reagują z karotenoidami przez przeniesienie elektronów według następującej reakcji:



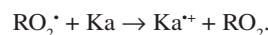
dalej kation rodnikowy Ka^{\cdot} ulega prawdopodobnie wygaszeniu w wyniku reakcji dysmutacji



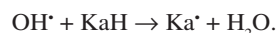
lub reakcji z askorbinianem



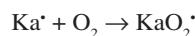
Karotenoidy reagują z rodnikami peroksyłowymi według reakcji:



reagują również z rodnikiem hydroksylowym OH^{\cdot} jako donory wodoru:



Ka^{\cdot} chociaż jest rodnikiem stabilnym, wolno reaguje z O_2 dając rodniki peroksyłowe



Rodniki KaO_2^{\cdot} stymulują dalej proces utleniania lipidów, co może tłumaczyć obserwowaną czasem *in vitro* prooksydacyjną aktywność karotenoidów. Zdolność karotenoidów do zabezpieczania przed degradacją przez wolne rodniki nienasyconych kwasów tłuszczowych, zależy od reaktywności produktów powstających z karotenoidów w wyniku reakcji z wolnymi rodnikami. Reaktywność produktów zależy z kolei od stężenia tlenu w otoczeniu.

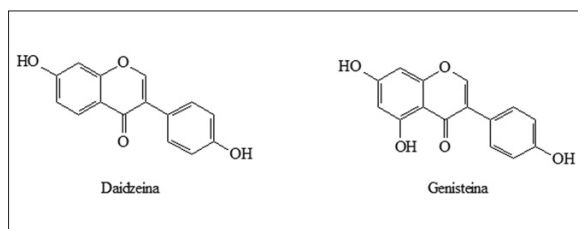
Nie wyjaśniono jednoznacznie czy karotenoidy odgrywają istotną rolę jako przeciwutleniacze chroniące błony komórkowe przed utlenianiem. Błony komórkowe zawierają znacznie więcej witaminy E niż karotenoidów, w związku z tym właśnie tej witaminie przypisuje się główną rolę w ochronie lipidów błonowych.

ZWIĄZKI FENOLOWE POCHODZENIA ROŚLINNEGO

Związki fenolowe lub polifenolowe w najprostszym ujęciu to substancje zawierające jedną lub więcej grup -OH związanych z pierścieniem aromatycznym. Do fenoli roślinnych zaliczamy flawonoidy, fenolokwasy, garbniki hydrolizujące i skondensowane. Roślinne fenole powstają na drodze dwóch podstawowych szlaków metabolicznych. Na drodze szlaku kwasu szikimowego powstają związki, takie jak kwas hydroksycynamonowy i kumaryny. Proste fenole i chinony powstają w wyniku przemian kwasu octowego. Bardziej złożone strukturalnie flawonoidy powstają w wyniku połączenia tych dwóch szlaków.

W roślinach, fenole pełnią różnorodną rolę. Na przykład stanowią substraty w reakcjach biosyntezy (np. kwas kawowy jest prekursorem ligninu), wytwarzane są w celu ochrony rośliny przed szkodliwym działaniem promieniowania ultrafioletowego. Stwierdzono na przykład, że mutanty rośliny *Arabidopsis* niezdolne do syntezy związków fenolowych, są bardziej podatne na niszczące działanie promieni ultrafioletowych [7,31]. Związki fenolowe, takie jak czerwone lub niebieskie antocyjany, żółte auroniny i chalkony przyciągają owady zapylające.





Ryc. 4. Wzór daidzeiny i genisteiny, izoflawonów występujących między innymi w soi

Większość związków fenolowych w warunkach *in vitro* wykazuje dużą aktywność przeciwutleniającą i przeciwolnorodnikową. Czasami jednak, podobnie do witaminy C, fenole roślinne redukując metale przejściowe stymulują procesy o charakterze oksydacyjnym [67]. Poza tym niektóre flawonoidy w obecności tlenu azotu (NO) wykazują aktywność prooksydacyjną [46].

Fenole roślinne występują dość powszechnie w diecie człowieka. Na przykład w zielonej i czarnej herbacie oraz w czerwonym winie znajdują się związki, takie jak epikatechina, katechina, epigallokatechina, galusan epikatechiny, kemferol, kwercetyna, mirycetyna, antocyjany (malwidyna, cyjanidyna) [53]. Większość z tych związków ma dużą aktywność przeciwutleniającą. W owocach cytrusowych znajdują się fenole o mniejszej aktywności przeciwutleniającej, takie jak pochodne naryngeniny, hesperetyny i taksyfolina. Pochodne kemferolu, kwercetyny (najpowszechniejszy związek flawonoidowy i silny przeciwutleniacz) i mirycetyny (jeden z najsilniejszych przeciwutleniaczy) występują w roślinach, takich jak cykoria, brokuł, rzodkiewka, grejpfrut, cebula, sałata, żurawina błotna, jabłko (skórka owocu), jagoda czarna, a także w czerwonym winie [2,37,29]. W białych i czerwonych winogronach, oliwkach, szpinaku, kapuście, szparagach, kawie, pomidorach, jabłkach, gruszkach, wiśniach, śliwkach, brzoskwinia, morelach i borówkach wykryto fenolokwasy, takie jak kawowy, chlorogenowy i p-kumarowy [1,3,30,45]. Ten ostatni wykazuje słabszą aktywność przeciwutleniającą i przeciwolnorodnikową. Soja jest bogata w glikozydy izoflawonów, takich jak genisteina i daidzeina (ryc. 4) oraz kwas kawowy, który jest silnym przeciwutleniaczem. Z ryżu uzyskano wyciągi wykazujące aktywność przeciwutleniającą, za którą jest odpowiedzialna izowitekksyna. Czarna i zielona herbata zawierają znaczne ilości katechin, które w warunkach *in vitro* wykazują dużą aktywność przeciwutleniającą [48,58]. Katechina, epikatechina i kwas galusowy mają duże znaczenie dla aktywności przeciwutleniającej czerwonego wina [57].

Dotychczas uważano, że związki fenolowe słabo się wchłaniają w jelitach i większość z nich jest wydalana. Jest jednak coraz więcej doniesień, że niektóre z nich np. kwercetyna są dobrze absorbowane w jelitach, nawet do 40% [22,36]. Fenole roślinne często występują w połączeniach

z cukrami jako glikozydy, które są hydrolizowane w jelitach do aglikonów i w takiej postaci dopiero są wchłaniane. Ilość wchłoniętej w jelicie kwercetyny lub innych fenoli nie znaczy oczywiście, że związki te są dostarczane do tkanek lub płynów ustrojowych w ilościach wystarczających do wywołania efektu biologicznego.

Wiele badań naukowych wskazuje na potencjalne znaczenie związków fenolowych jako przeciwutleniaczy. Na przykład fenole znajdujące się w czerwonym winie hamują utlenianie frakcji lipidowych krwi LDL w warunkach *in vitro*. Przypuszcza się, że mogą one *in vivo* aktywnie ochraniać mięsień sercowy, właśnie przez hamowanie utleniania LDL. Tym tłumaczono niewielką liczbę chorób serca w pewnych regionach Francji (tzw. French paradox), mimo istnienia wielu czynników sprzyjających powstaniu chorób serca (palenie tytoniu, spożycie dużych ilości tłuszczów zawierających nasycone kwasy tłuszczowe) [4,13,23]. Niektóre dane wskazują na odwrotną zależność między występowaniem choroby wieńcowej i zawałów serca u starszych mężczyzn a spożyciem pokarmów bogatych we flawonoidy (szczególnie kwercetynę) [25,54]. Do pokarmów tych zalicza się herbaty, owoce (np. jabłka) warzywa (np. cebula).

Aktywność przeciwutleniającą wykazują proste związki fenolowe, takie jak np. kwas kawowy, oraz bardziej złożone strukturalnie flawonoidy i najbardziej złożone, o dużej masie cząsteczkowej garbniki. Najwięcej uwagi poświęcono jednak flawonoidom, które są bardzo rozpowszechnione w roślinach i produktach pochodzących z roślin. W wielu krajach codzienne spożycie flawonoidów jest większe niż witaminy E. Większość flawonoidów wykazuje silną aktywność przeciwutleniającą *in vitro*. Hamują one skutecznie utlenianie lipidów oraz eliminują aktywne formy tlenu i azotu [51,68]. Flawonoidy mogą również wiązać kationy metali stymulujące procesy wolnorodnikowe oraz wykazują zdolność inhibicji wielu enzymów [55].

Podczas analizy fenoli jako przeciwutleniaczy należy brać pod uwagę biologiczne działanie rodników powstałych ze związków fenolowych podczas ich przeciwutleniającego działania. Chociaż są to rodniki stabilne, mogą jednak wykazywać działanie cytotoksyczne. Powstałe rodniki związków fenolowych mogą być zredukowane do związków niebędących rodnikami przez askorbinian, co wykazano w badaniach *in vitro* [28]. Podstawowa aktywność biologiczna związków fenolowych w organizmach człowieka i zwierząt nie musi być związana z ich właściwościami przeciwutleniającymi. Na przykład genisteina, daidzeina i być może inne flawonoidy, wykazują działanie estrogenne, hamują także kinazy białkowe [24]. Genisteina blokuje rozwój naczyń krwionośnych [74], co może być korzystne i przyczyniać się do hamowania wzrostu komórek nowotworowych.

PIŚMIENICTWO

[1] Abu-Amsha R., Croft K.D., Puddey I.B., Proudfoot J.M., Beilin L.J.: Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation *in vitro*: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. Clin. Sci., 1996; 91: 449–458

[2] Alvarez S., Zaobornyj T., Actis-Goretta L., Fraga C.G.: Boveris A. Polyphenols and red wine as peroxynitrite scavengers: a chemiluminescent assay. Ann. NY Acad. Sci., 2002; 957: 271–273

- [3] Antolovich M., Bedgood D.R. Jr., Bishop A.G., Jardine D., Prenzler P.D., Robards K.: LC-MS investigation of oxidation products of phenolic antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 2004; 52: 962–971
- [4] Aviram M., Fuhrman B.: Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. *Atherosclerosis*, 1998; 137 Suppl.: S45–50
- [5] Beck J.L., Durack M.C., Hamilton S.E., de Jersey J.: Irreversible inactivation of purple acid phosphatase by hydrogen peroxide and ascorbate. *J. Inorg. Biochem.*, 1999; 73: 245–252
- [6] Beyer R.E.: The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1994; 26: 349–358
- [7] Bieza K., Lois R.: An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol.*, 2001; 126: 1105–1115
- [8] Brigelius-Flohe R., Traber M.G.: Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.*, 1999; 13: 1145–1155
- [9] Britton G.: Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.*, 1995; 9: 1551–1558
- [10] Chakraborty H., Ray S.N., Chakrabarti S.: Lipid peroxidation associated protein damage in rat brain crude synaptosomal fraction mediated by iron and ascorbate. *Neurochem. Int.*, 2001; 39: 311–317
- [11] Chepda T., Cadau M., Lassabliere F., Reynaud E., Perier C., Frey J., Chamson A.: Synergy between ascorbate and alpha-tocopherol on fibroblasts in culture. *Life Sci.*, 2001; 69: 1587–1596
- [12] Chiueh C.C.: Iron overload, oxidative stress, and axonal dystrophy in brain disorders. *Pediatr. Neurol.*, 2001; 25: 138–147
- [13] Constant J.: Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox. *Coronary Artery Dis.*, 1997; 8: 645–649
- [14] Delclos K.B., Blumberg P.M.: Identification of ascorbic acid as the heat-stable factor from brain which inactivates the phorbol ester receptor. *Cancer Res.*, 1982; 42: 1227–1232
- [15] Dicker E., Cederbaum A.I.: NADH-dependent generation of reactive oxygen species by microsomes in the presence of iron and redox cycling agents. *Biochem. Pharmacol.*, 1991; 42: 529–535
- [16] Donnelly E.T., McClure N., Lewis S.E.: The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation *in vitro* on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis*, 1999; 14: 505–512
- [17] Evstigneeva R.P., Volkov I.M., Chudinova V.V.: Vitamin E as a universal antioxidant and stabilizer of biological membranes. *Membr. Cell Biol.*, 1998; 12: 151–172
- [18] Fraga C.G., Motchnik P.A., Shigenaga M.K., Helbock H.J., Jacob R.A., Ames B.N.: Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 11003–11006
- [19] Freedman J.E., Keaney J.F. Jr.: Vitamin E inhibition of platelet aggregation is independent of antioxidant activity. *J. Nutr.*, 2001; 131: 374S–377S
- [20] Fuhrmann H., Sallmann H.P.: Alpha-tocopherol and phospholipase A2 in liver and brain of chicks posthatching: the influence of dietary fat and vitamin E. *Ann. Nutr. Metab.*, 1995; 39: 302–309
- [21] Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Ascorbic acid (vitamin C). W: *Free Radicals in Biology and Medicine*, ed.: B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. Oxford University Press, Oxford 1999; 200–202
- [22] Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Auroma O.I.: The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radical. *Anal. Biochem.*, 1987; 165: 215–219
- [23] Heller F.R., Descamps O., Hondekjijn J.C.: LDL oxidation: therapeutic perspectives. *Atherosclerosis*, 1998; 137 Suppl.: S25–31
- [24] Hendrich S., Wang G.J., Lin H.K., Xu X., Tew B.Y., Wang H.J., Murphy P.A.: Isoflavone Metabolism and Bioavailability. W: *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*, ed.: Andreas M. Papas. CRC Press London, New York, Washington 1999; 211–230
- [25] Hertog M.G., Feskens E.J., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D.: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 1993; 342: 1007–1011
- [26] Hollman P.C., de Vries J.H., van Leeuwen S.D., Mengelers M.J., Katan M.B.: Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995; 62: 1276–1282
- [27] Jialal I., Fuller C.J.: Effect of vitamin E, vitamin C and beta-carotene on LDL oxidation and atherosclerosis. *Can. J. Cardiol.*, 1995; 11 Suppl G: 97G–103G
- [28] Kagan V.E., Yalowich J.C., Day B.W., Goldman R., Gantchev T.G., Stoyanovsky D.A.: Ascorbate is the primary reductant of the phenoxyl radical of etoposide in the presence of thiols both in cell homogenates and in model systems. *Biochemistry*, 1994; 33: 9651–9660
- [29] Kahkonen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M.: Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 1999; 47: 3954–3962
- [30] Kayano S., Kikuzaki H., Fukutsuka N., Mitani T., Nakatani N.: Antioxidant activity of prune (*Prunus domestica* L.) constituents and a new synergist. *J. Agric. Food Chem.*, 2002; 50: 3708–3712
- [31] Landry L.G., Chapple C.C., Last R.L.: Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol.*, 1995; 109: 1159–1166
- [32] Laughton M.J., Halliwell B., Evans P.J., Hoult J.R.: Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem. Pharmacol.*, 1989; 38: 2859–2865
- [33] Lee H.S., Csallany A.S.: The influence of vitamin E and selenium on lipid peroxidation and aldehyde dehydrogenase activity in rat liver and tissue. *Lipids*, 1994; 29: 345–350
- [34] Lee S.H., Yoon Y.C., Jang Y.Y., Song J.H., Han E.S., Lee C.S.: Effect of iron and ascorbate on cyclosporine-induced oxidative damage of kidney mitochondria and microsomes. *Pharmacol. Res.*, 2000; 43: 161–171
- [35] Liebler D.C., Burr J.A.: Oxidation of vitamin E during iron-catalyzed lipid peroxidation: evidence for electron-transfer reactions of the tocopheroxyl radical. *Biochemistry*, 1992; 31: 8278–8284
- [36] Liu Y., Hu M.: Absorption and metabolism of flavonoids in the caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model. *Drug Metab. Dispos.*, 2002; 30: 370–377
- [37] Lopez-Velez M., Martinez-Martinez F., Del Valle-Ribes C.: The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit. Rev. Food Sci.*, 2003; 43: 233–244
- [38] Lunec J., Blake D.R.: The determination of dehydroascorbic acid and ascorbic acid in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Free Radical Res. Com.*, 1985; 1: 31–39
- [39] Mathews-Roth M.M.: Beta-carotene therapy for erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. *Biochimie*, 1986; 68: 875–884
- [40] Mathews-Roth M.M.: Photoprotection by carotenoids. *Federation Proceedings*, 1987; 46: 1890–1893
- [41] May J.M., Qu Z., Morrow J.D.: Mechanisms of ascorbic acid recycling in human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001; 1528: 159–166
- [42] May J.M., Qu Z.C., Whitesell R.R., Cobb C.E.: Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radical Biol. Med.*, 1996; 20: 543–551
- [43] Mirvish S.S.: Effects of vitamins C and E on N-nitroso compound formation, carcinogenesis, and cancer. *Cancer*, 1986; 58: 1842–1850
- [44] Monji A., Morimoto N., Okuyama I., Yamashita N., Tashiro N.: Effect of dietary vitamin E on lipofuscin accumulation with age in the rat brain. *Brain Res.*, 1994; 634: 62–68
- [45] Nielsen J.K., Olsen C.E., Petersen M.K.: Acylated flavonol glycosides from cabbage leaves. *Phytochemistry*, 1993; 34: 539–344
- [46] Ohshima H., Yoshie Y., Auriol S., Gilibert I.: Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radical Biol. Med.*, 1998; 25: 1057–1065
- [47] Omaye S.T., Krinsky N.I., Kagan V.E., Mayne S.T., Liebler D.C., Bidlack W.R.: β -carotene: friend or foe? *Fund. Appl. Toxicol.*, 1997; 40: 163–174
- [48] Ostrowska J., Luczaj W., Kasacka I., Rozanski A., Skrzydlewska E.: Green tea protects against ethanol-induced lipid peroxidation in rat organs. *Alcohol*, 2004; 32: 25–32
- [49] Padh H.: Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. *Nutr. Rev.*, 1991; 49: 65–70
- [50] Peterkofsky B.: Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991; 54: 1135S–1140S
- [51] Pietta P.G.: Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 2000; 63: 1035–1042
- [52] Ramirez-Tortosa C., Andersen O.M., Gardner P.T., Morrice P.C., Wood S.G., Duthie S.J., Collins A.R., Duthie G.G.: Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radical Biol. Med.*, 2001; 31: 1033–1037



- [53] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G.: Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.*, 1995; 20: 933–956
- [54] Rimm E.B., Katan M.B., Ascherio A., Stampfer M.J., Willett W.C.: Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann. Intern. Med.*, 1996; 125: 384–389
- [55] Robak J., Gryglewski R.J.: Bioactivity of flavonoids. *Pol. J. Pharmacol.*, 1996; 48: 555–564
- [56] Sakuma N., Yoshikawa M., Hibino A., Sato A., Kamiya Y., Ohte N., Tamai N., Kijimatsu M., Kimura G., Inoue M.: Ascorbic acid protects against peroxidative modification of low-density lipoprotein, maintaining its recognition by LDL receptors. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 2001; 47: 28–31
- [57] Sanchez-Moreno C., Cao G., Ou B., Prior R.L.: Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry. *J. Agric. Food Chem.*, 2003; 51: 4889–4896
- [58] Sang S., Tian S., Wang H., Stark R.E., Rosen R.T., Yang C.S., Ho C.T.: Chemical studies of the antioxidant mechanism of tea catechins: radical reaction products of epicatechin with peroxy radicals. *Bioorg. Med. Chem.*, 2003; 11: 3371–3378
- [59] Santamaria L., Bianchi-Santamaria A., dell'Orti M.: Carotenoids in cancer, mastalgia, and AIDS: prevention and treatment – an overview. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 1996; 15: 89–95
- [60] Schaefer D.M., Liu Q., Faustman C., Yin M.C.: Supranutritional administration of vitamins E and C improves oxidative stability of beef. *J. Nutr.*, 1995; 125: 1792S–1798S
- [61] Schneider M., Diemer K., Engelhart K., Zankl H., Trommer W.E., Biesalski H.K.: Protective effects of vitamins C and E on the number of micronuclei in lymphocytes in smokers and their role in ascorbate free radical formation in plasma. *Free Radical Res.*, 2001; 3: 209–219
- [62] Seghieri G., Martinoli L., di Felice M., Anichini R., Fazzini A., Ciuti M., Miceli M., Gaspa L., Franconi F.: Plasma and platelet ascorbate pools and lipid peroxidation in insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1998; 28: 659–663
- [63] Sok D.E.: Ascorbate-induced oxidative inactivation of Zn²⁺-glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase. *J. Neurochem.*, 1998; 70: 1167–1174
- [64] Sokol R.J.: Vitamin E and neurologic deficits. *Adv. Pediatr.*, 1990; 37: 119–148
- [65] Steiner M.: Influence of vitamin E on platelet function in humans. *J. Am. Coll. Nutr.*, 1991; 10: 466–473
- [66] Stevenson L.M., Jones D.G.: Relationships between vitamin E status and erythrocyte stability in sheep. *J. Comp. Pathol.*, 1989; 100: 359–368
- [67] Sugihara N., Arakawa T., Ohnishi M., Furuno K.: Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. *Free Radical Biol. Med.*, 1999; 27: 1313–1323
- [68] Terao J.: Dietary flavonoids as antioxidants *in vivo*: conjugated metabolites of (–)-epicatechin and quercetin participate in antioxidative defense in blood plasma. *J. Med. Invest.*, 1999; 46: 159–168
- [69] van Metre D.C., Callan R.J.: Selenium and vitamin E. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 2001; 17: 373–402
- [70] van Poppel G., Goldbohm R.A.: Epidemiologic evidence for β-carotene and cancer prevention. *A. J. Clin. Nutr.*, 1995; 62: 1393S–1402S
- [71] Vermeer I.T., Moonen E.J., Dallinga J.W., Kleinjans J.C., van Maanen J.M.: Effect of ascorbic acid and green tea on endogenous formation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopiperidine in humans. *Mutat. Res.*, 1999; 428: 353–361
- [72] Vershinin A.: Biological functions of carotenoids – diversity and evolution. *Biofactors*, 1999; 10: 99–104
- [73] Wang X., Quinn P.J.: The location and function of vitamin E in membranes. *Mol. Membr. Biol.*, 2000; 17: 143–156
- [74] Wietrzyk J., Boratynski J., Gryniewicz G., Ryczynski A., Radzikowski C., Opolski A.: Antiangiogenic and antitumour effects *in vivo* of genistein applied alone or combined with cyclophosphamide. *Anticancer. Res.*, 2001; 21: 3893–3896
- [75] Yemelyanov A.Y., Katz N.B., Bernstein P.S.: Ligand-binding characterization of xanthophyll carotenoids to solubilized membrane proteins derived from human retina. *Exp. Eye Res.*, 2001; 72: 381–392
- [76] Zeng L.H., Wu J., Carey D., Wu T.W.: Trolox and ascorbate: are they synergistic in protecting liver cells *in vitro* and *in vivo*? *Biochem. Cell Biol.*, 1991; 69: 198–201
- [77] Zhang P., Omaye S.T.: Antioxidant and prooxidant roles for beta-carotene, alpha-tocopherol and ascorbic acid in human lung cells. *Toxicol. In Vitro*, 2001; 15: 13–24
- [78] Ziegler R.G., Mayne S.T., Swanson C.A.: Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes Control*, 1996; 7: 157–177