

## Ochronny wpływ kwasu fitynowego na peroksydację kwasu linolowego w warunkach *in vitro*

Protective effect of phytic acid on linoleic acid peroxidation *in vitro*

Alicja Zajdel<sup>1</sup>, Beata Parfiniewicz<sup>2</sup>, Adam Wilczok<sup>1</sup>, Ludmiła Węglarz<sup>2</sup>,  
Zofia Dzierżewicz<sup>1</sup>

### STRESZCZENIE

#### WSTĘP

Procesy wolnorodnikowe, prowadzące do oksydacyjnych uszkodzeń biomolekuł, pełnią ważną rolę w etiologii licznych schorzeń, włączając choroby nowotworowe. Kwas fitynowy (sześćfosforan mio-inozytolu, IP6) jest naturalnie rozpowszechnionym węglowodanem występującym obficie w diecie o dużej zawartości włókna pokarmowego, jak również obecnym w prawie wszystkich komórkach ssaków. Związek ten wykazuje szerokie spektrum działania biologicznego. Celem pracy było zbadanie, czy kwas fitynowy posiada zdolność do hamowania autooksydacji i peroksydacji kwasu linolowego indukowanej jonami Fe(II) w obecności kwasu askorbinowego oraz czy jest zdolny do unieszkodliwiania nadtlenu wodoru i chelatowania jonów Fe(II).

#### MATERIAŁ I METODY

Do zbadania antyoksydacyjnych właściwości IP6 w wybranych stężeniach (1-500  $\mu\text{M}$ ) zastosowano metody pozwalające ocenić stopień zmiatania nadtlenu wodoru oraz aktywność chelatującą jony Fe(II). Wpływ IP6 (1-500  $\mu\text{M}$ ) na autooksydację oraz indukowaną jonami Fe(II) w obecności kwasu askorbinowego peroksydację w micelach kwasu linolowego po 24 godzinach inkubacji określano stosując wysokosprawną chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) i detekcję UV.

#### WYNIKI

IP6 w sposób zależny od stężenia chelatował jony Fe(II). Procent schelatowanych jonów Fe(II) wynosił 11,9%, 58,6%, 69,3%, 87,1% odpowiednio dla stężeń IP6 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ . IP6 w stężeniach 100  $\mu\text{M}$  i 500  $\mu\text{M}$  znacząco hamował zanik kwasu linolowego zarówno w nieobecności i obecności układu redoks Fe(II)/kwas askorbinowy. Hamujący wpływ IP6 na indukowaną przez Fe(II)/kwas askorbinowy peroksydację

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biofarmacji  
Wydziału Farmaceutycznego  
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej SUM  
w Katowicach

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Biochemii  
Wydziału Farmaceutycznego  
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej SUM  
w Katowicach

#### ADRES

#### DO KORESPONDENCJI:

dr n. farm. Alicja Zajdel  
Katedra i Zakład Biofarmacji  
41-200 Sosnowiec, ul. Narcyzów 1  
tel. 32 3641063  
email: azajdel@sum.edu.pl

był mniejszy, ze względu na bezpośrednią interakcję IP6 z Fe(II). W nieobecności układu redoks Fe(II)/kwas askorbinowy, IP6 w stężeniach 100  $\mu\text{M}$  i 500  $\mu\text{M}$ , znacznie hamował rozpad wodoronadtlenków kwasu linolowego. IP6 nie był zdolny do zmiatania nadtlenu wodoru.

Wnioski: IP6 może działać jako naturalny antyoksydant w warunkach *in vitro*. Wyniki badań sugerują, że może on pełnić istotną rolę w modulowaniu poziomu wodoronadtlenków lipidowych w układach biologicznych.

#### SŁOWA KLUCZOWE

kwas fitynowy, peroksydacja lipidów, wodoronadtlenki kwasu linolowego

### ABSTRACT

#### BACKGROUND

Free radical processes are known to induce oxidative damage in biomolecules and thus, play an important role in the etiology of a number of diseases including cancer. Phytic acid (myo-inositol hexaphosphate, IP6) is a naturally occurring carbohydrate widely found in fiber-rich foods and also contained in almost all mammalian cells. This compound demonstrates various biological activities. The aim of this study was to clarify whether phytic acid possesses the ability to inhibit autooxidation and Fe(II)/ascorbate-induced peroxidation of linoleic acid, to scavenge of hydrogen peroxide, and chelate ferrous ions.

#### MATERIAL AND METHODS

The antioxidant properties of the IP6 at various concentrations (1-500  $\mu\text{M}$ ) have been evaluated by using the assays based on hydrogen peroxide scavenging and ferrous metal ions chelating activity determination. The effect of IP6 (1-500  $\mu\text{M}$ ) on autooxidation and Fe(II)/ascorbate-induced lipid peroxidation in micelles of linoleic acid after 24 h incubation was investigated using a reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with UV detection.

#### RESULTS

The Fe(II) chelating effects of IP6 were concentration-dependent. IP6 exhibited 11,9%, 58,6%, 69,3%, 87,1% of ferrous ions chelation at 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , respectively. IP6 at 100  $\mu\text{M}$  and 500  $\mu\text{M}$  effectively inhibited the disappearance of linoleic acid, both in the absence and the presence of Fe(II)/ascorbate. The inhibitory effect of IP6 on Fe(II)/ascorbate-induced lipid peroxidation was lower due to its direct interaction with Fe(II) ions. In the absence of Fe(II)/ascorbate, IP6 at 100  $\mu\text{M}$  and 500  $\mu\text{M}$  significantly suppressed decomposition of linoleic acid hydroperoxides. It was incapable of scavenging of hydrogen peroxide.

Conclusions: IP6 can act as a natural antioxidant *in vitro*. The obtained results suggest that it can play an important role in modulating lipid hydroperoxide level in biological systems.

#### KEY WORDS

phytic acid, lipid peroxidation, linoleic acid hydroperoxides

### WSTĘP

Długotrwałemu oddziaływaniu na organizm stresu oksydacyjnego wywołanego nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu oraz nieskuteczną obroną antyoksydacyjną, towa-

rzyszy wiele czynnościowych, morfologicznych oraz genetycznych modyfikacji struktur komórkowych prowadzących do rozwoju chorób przewlekłych, np. miażdżycy, cukrzycy, czy chorób nowotworowych. W układach biologicznych całkowitej, czteroelektronowej redukcji (z udziałem oksydazy cytochromo-

wej) cząsteczki tlenu do cząsteczki wody towarzyszy wytworzenie niezbędnej do życia energii. Natomiast wskutek niepełnej redukcji tlenu podczas przemian metabolicznych powstają nietrwałe, bardzo reaktywne produkty posiadające niesparowany elektron, zwane reaktywnymi formami tlenu (RFT). Należą do nich tlen singletowy, ozon, rodnik wodoronadtlenkowy, anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, nadtlarki organiczne oraz wykazujący największą reaktywność chemiczną rodnik wodorotlenowy ( $\cdot\text{OH}$ ), który powstaje w organizmie w reakcjach Fentona lub Habera-Weissa zachodzących z udziałem metali grup przejściowych. Pojawienie się jednej z RFT wywołuje powstanie następnych, przy czym kolejne reakcje z ich udziałem nie zawsze przebiegają w miejscu ich powstawania. W celu uzyskania bardziej stabilnej struktury, RFT reagują z różnymi składnikami komórek, oddziałują z białkami i lipidami, modyfikują aktywność enzymów, utleniają nienasycone kwasy tłuszczowe w błonach komórkowych oraz uszkodzają strukturę DNA [1, 2]. Jednym ze skutków działania RFT na błony biologiczne jest peroksydacja lipidów. W wyniku tego procesu powstają aktywne biologicznie pierwotne oraz wtórne produkty peroksydacji lipidów. Pierwotnymi nierodnikowymi produktami peroksydacji lipidów są względnie stabilne cykliczne endonadtlenki i wodoronadtlenki nienasyconych kwasów tłuszczowych, z których w wyniku dalszych przemian powstają bardzo aktywne biologicznie końcowe produkty peroksydacji lipidów, np. aldehydy i hydroksyaldehydy. Wtórne produkty peroksydacji lipidów charakteryzują się różną długością łańcucha węglowodorowego, różnym stopniem nienasyceń, mogą także zawierać różną ilość grup hydroksylowych [3, 4]. Związki te, w zależności od swej struktury, wykazują bardzo szeroki i zróżnicowany zakres działania na procesy zachodzące w organizmach żywych zarówno na poziomie genetycznym jak i biochemicznym [4]. Pełnią funkcję patofizjologicznych modulatorów procesów transdukcji sygnałów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych i mogą być czynnikiem przyczynowym wielu chorób [5].

Powszechnie znany jest pogląd, iż dieta bogata w składniki o wysokiej zawartości włókna pokarmowego, takie jak pełne ziarna zbóż, otręby, nasiona roślin strączkowych i oleistych wykazuje działanie korzystne na organizm, zapobiegające rozwojowi wielu chorób. Obser-

wowane efekty ochronne przypisywane są wysokiej zawartości błonnika i obecności kwasu fitynowego (sześćfosforanu mio-inozytolu, IP6). IP6 jest naturalnie rozpowszechnionym węglowodanem występującym obficie w diecie o dużej zawartości włókna pokarmowego, jak również obecnym w prawie wszystkich komórkach ssaków [6]. Stwierdzono, iż związek ten wykazuje szereg różnorodnych funkcji biologicznych, m. in. posiada właściwości zapobiegające rozwojowi nowotworów oraz kontrolujące wzrost, progresję i przerzutowanie eksperymentalnie indukowanych nowotworów. Jedną z hipotez przeciwnowotworowej aktywności IP6 nawiązuje do jego właściwości antyoksydacyjnych związanych z silnymi zdolnościami do chelatowania jonów metali (żelaza, miedzi) katalizujących syntezę rodników hydroksylowych w reakcjach Fentona i Habera-Weissa, a także związanych z hamowaniem powstawania RFT w reakcjach katalizowanych przez oksydazę ksantynową [7-9].

Niejednoznaczne wyniki badań eksperymentalnych dotyczące wpływu IP6 na procesy wolnorodnikowe, w tym peroksydację lipidów stały się dla nas inspiracją do podjęcia badań, których celem było określenie wpływu IP6 na autooksydację i indukowaną jonami żelaza (II) w obecności kwasu askorbinowego peroksydację kwasu linolowego oraz zbadanie oddziaływania IP6 z jonami żelaza i nadtlarkiem wodoru. W celu określenia poziomu peroksydacji oznaczano wodoronadtlenki kwasu linolowego jako pierwotne produkty peroksydacji oraz pozostały kwas linolowy. Jako metodę analityczną wykorzystano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), która umożliwiła bezpośrednie oznaczanie kwasu linolowego i jego wodoronadtlenków (HPODE) w mieszaninach inkubacyjnych.

## MATERIAŁ I METODY

### Zdolność IP6 do chelatowania jonów żelaza (II)

Zdolność IP6 do chelatowania jonów żelaza (II) badano stosując metodę spektrofotometryczną bazującą na barwnej reakcji ferrozyny z wolną frakcją jonów Fe (II) w roztworze [10]. Do 0,4 ml roztworów IP6 dodawano 0,05 ml 2 mM roztworu  $\text{FeCl}_2$ , po wymieszaniu dodawano 0,2 ml 5 mM roztworu ferrozyny, uzupełniano etanolem do objętości 4 ml i ponownie

intensywnie mieszano. Stężenia IP6 wynosiły 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , a jonów Fe(II) 25  $\mu\text{M}$ . Próby kontrolne zawierały ferrozynę i  $\text{FeCl}_2$  bez IP6. Po 10 min. inkubacji w temperaturze pokojowej dokonywano pomiarów absorbancji przy długości fali 562 nm. Procent hamowania przez IP6 powstawania barwnego kompleksu ferrozyna-Fe(II) obliczano korzystając ze wzoru:

$$\% \text{ schelatowanych jonów żelaza (II)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\%$$

gdzie  $A_0$  to absorbancja prób kontrolnych (niezawierających IP6), a  $A_1$  absorbancja roztworów zawierających IP6 w różnych stężeniach.

#### Zdolność IP6 do zmiatania nadtlenu wodoru

Zdolność IP6 do zmiatania nadtlenu wodoru badano stosując metodę opisaną przez Gulcin [10]. Do roztworów o objętości 3,4 ml zawierających różne ilości IP6 w buforze fosforanowym dodawano 0,6 ml 40 mM roztworu nadtlenu wodoru w buforze fosforanowym. Stężenia IP6 wynosiły 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ . Próby kontrolne zawierały bufor fosforanowy bez nadtlenu wodoru. Absorbancję roztworów mierzono przy długości fali 230 nm bezpośrednio po zmieszaniu, a następnie w odstępach 5 minutowych przez 30 minut. Procent rozłożonego nadtlenu wodoru przez IP6 obliczano korzystając ze wzoru:

$$\% \text{ rozłożonego nadtlenu wodoru} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\%$$

gdzie  $A_0$  to absorbancja prób kontrolnych (niezawierających IP6), a  $A_1$  absorbancja roztworów zawierających IP6 w różnych stężeniach.

#### Autooksydacja i indukowana jonami żelaza (II) w obecności kwasu askorbinowego peroksydacja kwasu linolowego

Autooksydację oraz indukowaną jonami żelaza (II) w obecności kwasu askorbinowego peroksydację kwasu linolowego prowadzono w mieszaninach o objętości 1 ml zawierających roztwór kwasu linolowego o stężeniu 1 mM w 50 mM buforze HEPES o pH 7,4 oraz IP6 w stężeniach 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ . Próby z indukowaną peroksydacją dodatkowo zawierały  $\text{FeCl}_2$  w stężeniu 20  $\mu\text{M}$  oraz kwas askorbinowy w stężeniu 100  $\mu\text{M}$ . Mieszaniny reakcyjne inkubowano bez dostępu światła przez 24 h w 37°C intensywnie mieszając przez wytrząsanie.

#### Analizy HPLC kwasu linolowego i jego wodoronadtlenków

Przed wykonaniem analiz chromatograficznych do próbek zawierających produkty peroksydacji kwasu linolowego dodawano po 1 ml metanolu, mieszano przez wytrząsanie, następnie filtrowano przez sączki Millex GV13 o średnicy porów 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore). Do rozdzielaczy chromatograficznych stosowano chromatograf ciekłowy Hewlett Packard typ 1050 z detektorem diodowym typ 1100 i oprogramowaniem HPLC ChemStation A.06.03. Analizę produktów peroksydacji kwasu linolowego prowadzono na kolumnie Eurospher 100 C18 (Saulentechnik Knauer; 250 x 4 mm), w temperaturze 35°C. Produkty peroksydacji kwasu linolowego oraz kwas linolowy eluowano mieszaniną 0,1 % roztworu kwasu fosforowego w acetonitrylu i 0,1 % roztworu kwasu fosforowego w wodzie v/v 80 : 20 przy szybkości przepływu fazy ruchomej 1 ml/min. Na kolumnę chromatograficzną nanoszono 40  $\mu\text{l}$  próby. Detekcję spektrofotometryczną prowadzono w zakresie UV. Do monitorowania zawartości wodoronadtlenków kwasu linolowego wykorzystywano długość fali  $\lambda = 234 \text{ nm}$ . Zanik kwasu linolowego monitorowano przy 206 nm. Stężenia kwasu linolowego i jego wodoronadtlenków po 24 h autooksydacji i peroksydacji indukowanej jonami Fe(II)/kwas askorbinowy w nieobecności i obecności IP6 w różnych stężeniach (1-500  $\mu\text{M}$ ) obliczano na podstawie wcześniej sporządzonych krzywych wzorcowych.

#### Analiza statystyczna

Wyniki badań otrzymane z 3-5 niezależnych serii eksperymentów poddano weryfikacji statystycznej stosując średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe (SD) oraz jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA i test Tukey'a. Za znamienne statystycznie przyjęto zmiany przy poziomie istotności  $p < 0,05$ .

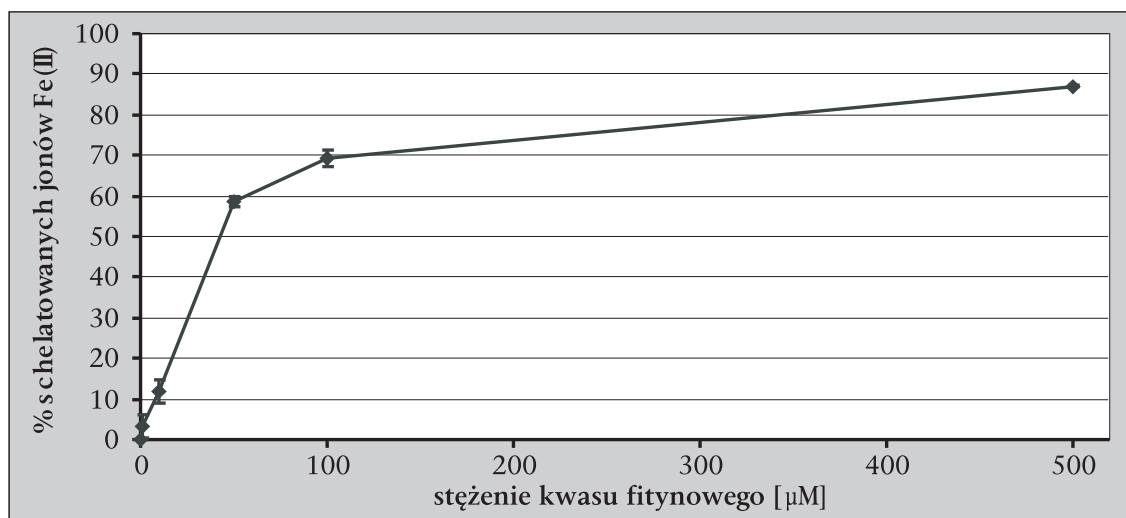
## WYNIKI

#### Zdolność IP6 do chelatowania jonów żelaza (II)

Wyniki badań chelatującej aktywności IP6 z zastosowaniem metody spektrofotometrycznej bazującej na barwnej reakcji ferrozyny z wolną frakcją jonów Fe(II) w roztworze wykazały, że IP6 w badanym zakresie stężeń (1 - 500  $\mu\text{M}$ ) jest zdolny do kompleksowania tych jonów. Procent schelatowanych jonów że-

laza zależał od stężenia IP6 (Ryc. 1). IP6 w najniższym stężeniu 1  $\mu\text{M}$  skompleksował  $3,44 \pm 2,91$  % jonów Fe(II), analiza statystyczna nie wykazała znamienych różnic w porówna-

Zdolność IP6 do zmiatania nadtlenu wodoru  
Nie zaobserwowano żadnych zmian wartości absorbancji w próbach zawierających różne stężenia IP6 (1-500  $\mu\text{M}$ ) w stosunku do kon-



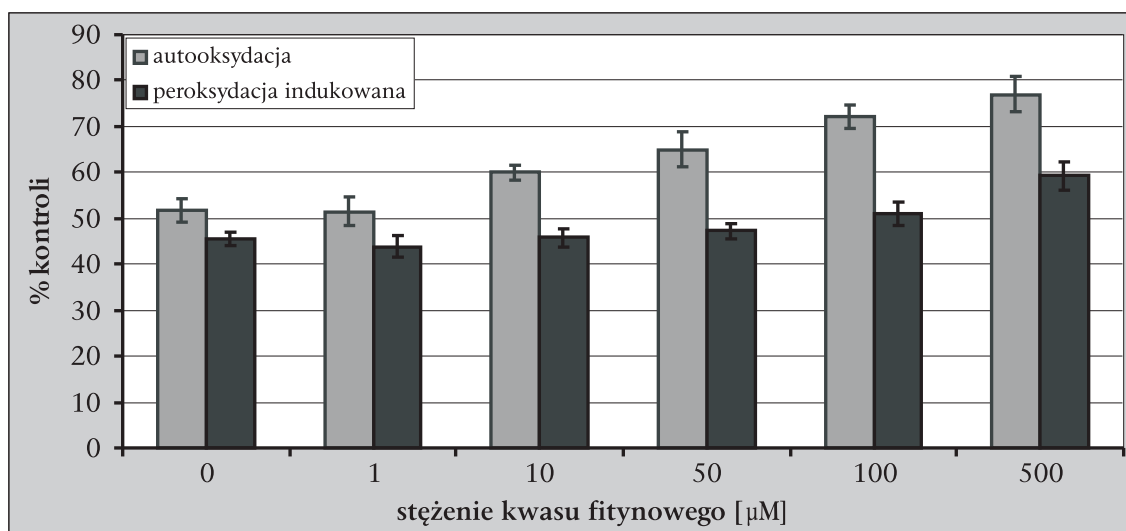
**Rycina 1.** Procent schelatowanych jonów Fe(II) przez IP6 (0-500  $\mu\text{M}$ ). Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SD z 3 eksperymentów.

**Figure 1.** Ferrous ions chelating effect of IP6 at various concentrations (0-500  $\mu\text{M}$ ). Results are the mean  $\pm$  SD of 3 experiments.

niu do kontroli. Różnice statystycznie istotne obserwowano w próbach zawierających IP6 w stężeniu równym lub większym od 10  $\mu\text{M}$ , przy czym 20-krotny nadmiar IP6 (500  $\mu\text{M}$ ) w stosunku do jonów żelaza (25  $\mu\text{M}$ ) spowodował związanie 87% tych jonów.

troli, co świadczy o braku jego zdolności do rozkładu nadtlenu wodoru.

Autooksydacja i indukowana jonami żelaza (II) w obecności kwasu askorbinowego peroksydacja kwasu linolowego



**Rycina 2.** Wpływ IP6 (0-500  $\mu\text{M}$ ) na ilość kwasu linolowego (wyrażoną jako % kontroli) po 24 godzinach autooksydacji oraz indukowanej jonami Fe(II) w obecności kwasu askorbinowego peroksydacji. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SD z 5 eksperymentów.

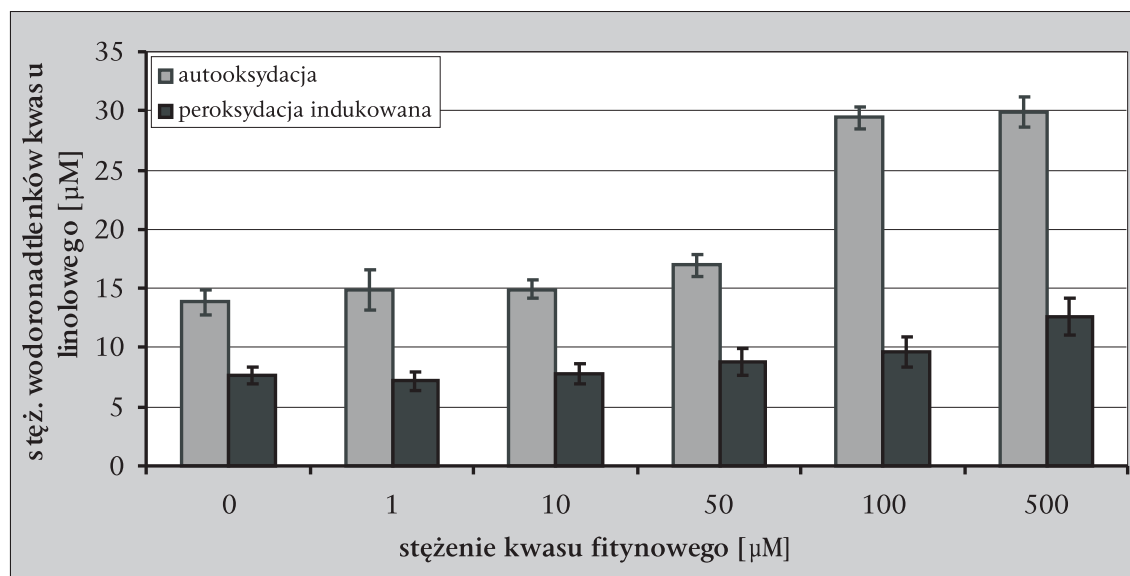
**Figure 2.** Effect of IP6 (0-500  $\mu\text{M}$ ) on the amount of linoleic acid (expressed as percent of the control) after 24 h autooxidation and Fe(II)/ascorbate - induced peroxidation. Results are the mean  $\pm$  SD of 5 experiments.

W celu uzyskania informacji o wpływie IP6 na autooksydację i indukowaną jonami żelaza (II) w obecności kwasu askorbinowego peroksydację kwasu linolowego wykonywano rozdzielczości chromatograficzne po 24 godzinach inkubacji kwasu linolowego (1 mM) w nieobecności i obecności IP6 (1-500  $\mu\text{M}$ ). Analizowano zanik kwasu linolowego, pik charakteryzujący się czasem retencji 8,13 min. oraz powstające izomery wodoronadtlenków tego kwasu (HPODE) o czasie retencji 3,62 min.

IP6 w sposób zależny od stężenia hamował autooksydację i indukowaną jonami Fe(II)/kwas askorbinowy peroksydację kwasu linolowego (Ryc. 2). IP6 w stężeniu 1  $\mu\text{M}$  nie wpływał na zanik kwasu linolowego spowodowany autooksydacją ( $p > 0,05$ ). IP6 w stężeniu równym 10  $\mu\text{M}$  lub większym w sposób znamieny statystycznie hamował utlenianie kwasu linolowego w odniesieniu do kontroli. Jednak, nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w ilościach utlenionego kwasu linolowego w próbach inkubowanych w obecności IP6 w stężeniach 10  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$  oraz w próbach zawierających IP6 w stężeniach 100  $\mu\text{M}$  i 500  $\mu\text{M}$ . W próbach z indukowaną peroksydacją IP6 w stężeniach 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$  nie wpływał na zanik kwasu linolowego, natomiast w stężeniach 100  $\mu\text{M}$

i 500  $\mu\text{M}$  znamienie statystycznie zmniejszał ilość utlenionego kwasu linolowego, jednak nie wykazano istotnych różnic pomiędzy tymi próbami. Jak widać na rycinie 2, IP6 jest zdolny do silniejszego hamowania autooksydacji niż indukowanej jonami żelaza (II) w obecności kwasu askorbinowego peroksydacji kwasu linolowego.

Na rycinie 3 przedstawiono ilość wytworzonych HPODE w próbach poddanych autooksydacji oraz indukowanej peroksydacji w obecności różnych stężeń IP6 (0-500  $\mu\text{M}$ ). W próbach poddanych autooksydacji w obecności IP6 w stężeniach 1  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  analiza statystyczna średnich arytmetycznych stężeń HPODE wskazała na brak istotnych różnic w poziomie HPODE. Natomiast w próbach zawierających IP6 w stężeniach 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  i 500  $\mu\text{M}$ , ilość HPODE znacząco zwiększyła się. W obecności IP6 w stężeniach 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  i 500  $\mu\text{M}$  współczynnik konwersji kwasu linolowego do jego wodoronadtlenków wynosił odpowiednio 4,84%, 10,56% i 12,98%. W próbach z indukowaną peroksydacją jonami Fe(II)/kwas askorbinowy zawierających IP6 w stężeniach 0-100  $\mu\text{M}$  nie zaobserwowano znamienych statystycznie różnic w ilościach wytworzonych HPODE. W obecności IP6 w stężeniu 500  $\mu\text{M}$ , tylko 3,1% kwasu lino-



**Rycina 3.** Wpływ IP6 (0-500  $\mu\text{M}$ ) na stężenie wodoronadtlenków kwasu linolowego ( $\mu\text{M}$ ) po 24 godzinach autooksydacji oraz indukowanej jonami Fe(II) w obecności kwasu askorbinowego peroksydacji kwasu linolowego. Wyniki stanowią średnią  $\pm$  SD z 5 eksperymentów.

**Figure 3.** Effect of IP6 (0-500  $\mu\text{M}$ ) on hydroperoxides of linoleic acid (HPODE) concentration ( $\mu\text{M}$ ) after 24 h autooxidation and Fe(II)/ascorbate induced linoleic acid peroxidation. Results are the mean  $\pm$  SD of 5 experiments.

lowego, który uległ utlenieniu zostało przekształcone w HPODE. Współczynnik konwersji kwasu linolowego do jego wodoronadtlenków świadczący o hamowaniu rozpadu pierwotnych produktów peroksydacji lipidów, był wyższy w próbach, które poddano autooksydacji, w porównaniu z próbami z indukowaną peroksydacją.

#### DYSKUSJA

Po raz pierwszy postulowano, że IP6 może działać jako naturalny antyoksydant już w 1984 roku [11]. Zastosowanie metody spektrofotometrycznej bazującej na pomiarze tworzonego formaldehydu w obecności dimetylosulfotlenku pozwoliło na wykazanie zdolności IP6 do całkowitego zablokowania wytwarzania rodnika hydroksylowego ( $\cdot\text{OH}$ ) w reakcji Fentona przy stosunku molowym IP6 : żelazo wynoszącym 0.25 [12]. Badania z wykorzystaniem techniki elektronowego rezonansu spinowego (ESR) pozwalającej na bezpośredni pomiar powstających rodników potwierdziły przeciwrodnikowe właściwości IP6, który wskutek chelatowania jonów żelaza (III) uniemożliwia generowanie  $\cdot\text{OH}$  w reakcji Fentona, jednocześnie nie obserwowano wpływu IP6 ani mio-inozytolu na generowanie anionorodnika ponadtlenkowego w często stosowanym *in vitro* układzie ksantyna/oksydaza ksantynowa [13]. Późniejsze badania udowodniły zdolność IP6 do zmniejszenia produkcji anionorodnika ponadtlenkowego wskutek hamowania aktywności oksydazy ksantynowej [8]. Dowiedziono, że IP6 hamuje powstawanie oksydacyjnych modyfikacji DNA, mimo że nie jest zdolny do zmiatania RFT. Zjawisko to jest tłumaczone chelatującymi właściwościami IP6. Związek ten wiążąc jony metali zapobiega rozkładowi nadtlenu wodoru, któremu towarzyszy generowanie RFT [14]. Wyniki naszych badań pokazują brak zdolności IP6 do zmiatania nadtlenu wodoru.

Aktualne doniesienia literaturowe podają, że IP6 wiąże jony Fe(III) z wysokim powinowactwem poprzez wszystkie dostępne miejsca koordynacyjne wiązania tych jonów. Za całkowite zablokowanie aktywności katalitycznej żelaza odpowiadają grupy fosforanowe w pozycjach 1, 2, 3 IP6, co tłumaczy zdolność mniej ufosforylowanych cząsteczek mio-inozytolu IP5, IP4, IP3, ale nie IP2, do hamowa-

nia generowania  $\cdot\text{OH}$  oraz hamowania indukowanej jonami żelaza peroksydacji lipidów i katalizowanej obecnością żelaza rozpadu wodoronadtlenków lipidowych, chociaż efektywność hamowania tych procesów maleje wraz ze stopniem ich defosforylacji [15, 16].

Indukcja peroksydacji zachodzi w warunkach, które determinowane są takimi czynnikami jak stężenie jonów metali przejściowych, chelatorów, kwasu askorbinowego, prężność tlenu oraz wzajemnymi ich proporcjami [3]. Bucher i wsp. [17] wykazali, że do zainicjowania procesu peroksydacji przez chelaty Fe(II) jest wymagana obecność Fe(III). Minotti i Aust [18] dowiedli, że największa szybkość procesu peroksydacji jest osiągana, gdy stosunek Fe(II) : Fe(III) jest bliski jedności. Proces peroksydacji lipidów zachodzi ze znacznie większą szybkością i wydajnością, gdy do mieszanin inkubacyjnych oprócz żelaza wprowadzi się kwas askorbinowy, ponieważ zapewnia on optymalny stosunek Fe(II) : Fe(III) poprzez redukcję pewnych ilości Fe(III) do Fe(II) [19]. Ponadto, w obecności jonów żelaza lub miedzi pierwotne produkty peroksydacji, takie jak wodoronadtlenki nienasyconych kwasów tłuszczowych i stabilne cykliczne endonadtlenki mogą ulegać rozkładowi prowadzącemu do powstania produktów wolnorodnikowych zdolnych do inicjowania procesu peroksydacji lipidów. Zjawisko to jest określane jako reinicjacja procesu peroksydacji lipidów [20]. W obecności Fe(II) wytwarzany jest rodnik alkoksylowy  $\text{LO}\cdot$ , a w obecności Fe(III) rodnik nadtlenny  $\text{LOO}\cdot$  [21]. IP6 także może wpływać na potencjał oksydacyjno-redukcyjny jonów żelaza przyspieszając zarówno redukcję Fe(III) przez kwas askorbinowy, jak i utlenienie Fe(II) przez tlen cząsteczkowy [12].

Powszechnie stosowana metoda oznaczania wodoronadtlenków lipidowych bazuje na pomiarze spektrofotometrycznym produktów rozpadu tych związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). Metoda ta, prosta w zastosowaniu, obarczona jest jednak dużym błędem wynikającym z niespecyficzności stosowanego testu [22]. Zastosowana w naszych badaniach metoda z wykorzystaniem techniki HPLC umożliwiła bezpośrednio oznaczanie kwasu linolowego i jego wodoronadtlenków powstających podczas autooksydacji i peroksydacji indukowanej jonami żelaza (II) w obecności kwasu askorbinowego w mieszaninach bez i z dodatkiem IP6. Rezultaty przedstawionych ekspery-

tów pokazują, że IP6 w sposób zależny od stężenia hamuje zarówno autooksydację jak i indukowaną jonami Fe(II)/kwas askorbinowy peroksydację kwasu linolowego oraz stabilizuje powstające wodoronadtlenki tego kwasu i zapobiega dalszym ich przekształceniom w toksyczne, wtórne produkty peroksydacji lipidów. Obserwacje te korespondują z naszymi wcześniejszymi badaniami i mogą tłumaczyć zmniejszone powstawanie wtórnych produktów peroksydacji lipidów w komórkach Caco-2 ekspozowanych na działanie IP6 w obecności żelaza i kwasu askorbinowego [23]. Stabilizujący wpływ IP6 na wodoronadtlenki kwasu linolowego, będące regulatorami i mediatorami metabolizmu, sugeruje możliwość zastosowania IP6 w prewencji wielu chorób, np. miażdżycy, gdyż dowiedziono, że w komórkach śródbłonna HPODE stymulują ekspresję syntazy tlenu azotu, co jest jednym z mechanizmów kompensacji oksydacyjnych uszkodzeń naczyń we wczesnych stadiach hipercholesterolemii [24]. Istotnym wydaje się także fakt silniejszego hamowania autooksydacji niż indukowanej jonami żelaza (II) w obecności kwasu askorbinowego peroksydacji kwasu linolowego przez IP6. Ponadto, współczynnik konwersji kwasu linolowego do jego wodoronadtlenków świadczący o hamowaniu rozpadu pierwotnych produktów peroksydacji lipidów, jest wyższy w próbach, które poddano autooksydacji, w porównaniu z próbami z indukowaną peroksydacją. Zjawisko to można wyjaśnić niecałkowitym chelatowaniem jonów Fe(II) przez IP6. Wyniki badań chelatującej aktywności IP6 z zastosowaniem metody spektrofotometrycznej bazującej na barwnej reakcji ferrozyny z wolną frakcją jonów Fe(II) w roztworze wskazują, że procent schelatowanych jonów żelaza zależy od stężenia IP6, przy czym 20-krotny nadmiar IP6 w stosunku do jonów żelaza powoduje związanie zaledwie 87% tych jonów. W piśmiennictwie istnieją prace traktujące o wpływie IP6 na proces peroksydacji lipidów indukowanej jonami żelaza w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, natomiast niewiele jest doniesień literaturowych opisujących wpływ IP6 na procesy autooksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych. Dowiedziono, że IP6 hamuje indukowaną jonami Fe(III) peroksydację kwasu arachidonowego [12], w stężeniu 1 mM hamuje peroksydację lipidów w 50% emulsji olej sojowy w wodzie [25] oraz powstawanie TBARS w micelach kwasu linolowego przy sto-

sunku molowym IP6: żelazo od 0.51 :1 do 10 : 1 [26].

Rezultaty naszych badań są zgodne z obserwacjami Miyamoto i wsp. [16], którzy opisują hamowanie przez IP6 w stężeniu 100  $\mu$ M powstawania wodoronadtlenków fosfatydylocholino w zawiesinie liposomalnej, w której peroksydację indukowano jonami żelaza (III) w obecności kwasu askorbinowego. Ponadto, autorzy wykazali hamujący wpływ IP6 (100  $\mu$ M) na rozpad wodoronadtlenków fosfatydylocholino katalizowany jonami żelaza (III). Odmienny wpływ IP6 na peroksydację lipidów w modelowej emulsji spożywczej, jaką jest majonez wzbogacony w obfitujący w nienasycone kwasy tłuszczowe olej rybi, obserwowali Nielsen i wsp. [27]. Autorzy ci badając pierwotne i wtórne produkty peroksydacji lipidów stwierdzili, że IP6 nie wykazuje żadnych właściwości anty- lub prooksydacyjnych w testowanym przedziale stężeń przy stosunku molowym IP6 : żelazo od 0.5 : 1 do 4 : 1. Brak spodziewanego efektu antyoksydacyjnego IP6 autorzy tłumaczą niskim pH majonezu, które może wpływać na stabilność kompleksów Fe-IP6. Udowodniono hamujący wpływ IP6 na autooksydację nienasyconych kwasów tłuszczowych w modelach produktów spożywczych, 2% emulsji olej sojowy w wodzie [28] oraz mięsie wieprzowym i wołowym [29], jednocześnie stwierdzono, że naświetlanie promieniowaniem gamma nie zmienia aktywności antyoksydacyjnej IP6.

W badaniach z zastosowaniem hodowli komórkowych i modeli zwierzęcych efekt wypadkowy procesu peroksydacji lipidów zależy nie tylko od obecności i stężenia czynników prooksydacyjnych w komórce, ale również od czynników, które chronią komórki przed oksydacją oraz od ich wzajemnego oddziaływania. Stwierdzono mianowicie, że IP6 w hodowlach Caco-2 zmniejsza przenikanie jonów żelaza do wnętrza komórek, jednakże wprowadzenie do hodowli kwasu askorbinowego w stężeniach wyższych niż 0,064 mM powoduje wzrost wychwytu jonów żelaza przez te komórki i w rezultacie nasilenie procesów wolnorodnikowych, ponieważ w obecności kwasu askorbinowego jony żelaza mogą być pobierane przez komórki z kompleksów fitynian : żelazo. Ponadto, w warunkach hodowli komórek, IP6 może tworzyć chelaty z obecnymi w pożywce hodowlanej jonami magnezu i wapnia. Poprzez zmianę stężenia jonów metali IP6 może modyfikować aktywność enzymów ko-



mórkowych, w tym enzymów antyoksydacyjnych [30]. Badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych pokazują, że IP6 może wykazywać zarówno właściwości antyoksydacyjne jak i prooksydacyjne. Lee i wsp. [31] stosując suplementację diety IP6 i/lub inozytolem, rozpoczętą tydzień przed podaniem szczurom dietylonitrozoaminy, obserwowali wyraźny wzrost aktywności transferazy glutationowej oraz zahamowanie peroksydacji lipidów. Podobny efekt opisali Hassan i wsp. [32], którzy wykazali zmniejszony poziom peroksydacji lipidów oraz zwiększony poziom glutationu w homogenatach wątrobowych szczurów ekspozowanych na czterochlorek węgla w obecności IP6. Odmienne rezultaty uzyskali Kitamura i wsp. [33]. Stosowanie diety wzbogaczonej w IP6 u szczurów z ostrą niewydolnością wątroby, spowodowaną nadmierną kumulacją miedzi i żelaza, nie spowodowało zahamowania peroksydacji lipidów i zmniejszenia uszkodzeń wątroby. Wyniki eksperymentów opisanych przez Rimbacha i Pallauf [34] wykazały wysoką wrażliwość homogenatów wątrobowych szczurów, u których stosowano dietę wzbogaconą w IP6 na indukowaną żelazem peroksydację lipidów w warunkach zmniejszonego stężenia jonów magnezu wywołanego suplementacją diety IP6. Zmiana proporcji między stężeniami jonów magnezu i żelaza spowodowała zwiększenie w hepatocytach stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) oraz obniżenie poziomu zredukowanego glutationu, co przemawia za faktem, że w warunkach obniżonego stężenia magnezu, IP6 wykazuje działanie prooksydacyjne a nie antyoksydacyjne.

Zdolność IP6 do hamowania zarówno autooksydacji jak i indukowanej jonami żelaza w obecności kwasu askorbinowego peroksydacji lipidów na etapie stabilizowania pierwotnych produktów tych procesów wskazuje na dodatkowy mechanizm jego antyoksydacyjnego oddziaływania w warunkach *in vivo*. Taka jego aktywność biologiczna może przyczynić

się nie tylko do zmniejszenia toksycznych produktów powstałych z rozpadu wodoronadtlenków lipidowych, ale jednocześnie może zapewnić optymalny poziom tych związków uważanych za ważne regulatory i mediatory metabolizmu komórkowego. W tym kontekście zastosowanie IP6 jako czynnika prewencyjnego wydaje się być uzasadnione w chorobach, w etiopatogenezie, których postuluje się udział RFT.

#### WNIOSKI

1. IP6 w sposób zależny od stężenia chelatów jony Fe(II), przy czym 20-krotny nadmiar IP6 w stosunku do jonów Fe(II) spowodował związanie zaledwie 87% tych jonów.
2. IP6 w stężeniach 100  $\mu\text{M}$  i 500  $\mu\text{M}$  znacząco hamował utlenianie kwasu linolowego zarówno podczas autooksydacji, jak i peroksydacji indukowanej jonami Fe(II) w obecności kwasu askorbinowego. Hamujący wpływ IP6 na indukowaną peroksydację był mniejszy, ze względu na bezpośrednią interakcję IP6 i Fe(II).
3. Podczas autooksydacji kwasu linolowego IP6 w stężeniach 100  $\mu\text{M}$  i 500  $\mu\text{M}$  znacznie hamował rozpad wodoronadtlenków kwasu linolowego.
4. IP6 nie był zdolny do zmiatania nadtlenu wodoru.
5. W układach biologicznych IP6, poprzez stabilizujący wpływ na wodoronadtlenki lipidowe, może nie tylko zapobiegać generowaniu toksycznych produktów podczas ich rozpadu, ale także uczestniczyć w modulowaniu poziomu tych związków, będących mediatorami i regulatorami metabolizmu, co sugeruje celowość jego stosowania w prewencji i terapii chorób, których mechanizm powstawania i rozwoju związany jest z zaburzoną równowagą prooksydacyjno - antyoksydacyjną.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 1-85.
2. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* 1991; 91: 14-22.
3. Rice-Evans C., Burdon R. Free radical-lipid interaction and their pathological consequences. *Prog. Lipid Res.* 1993; 32: 71-110.
4. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 11: 81-128.

5. Comporti M. Lipid peroxidation and biogenic aldehydes: from the identification of 4-hydroxynonenal to further achievements in biopathology. *Free Radic. Res.* 1998; 28: 623-635.
6. Graf E., Eaton J.W. Dietary suppression of colonic cancer. Fiber or phytate? *Cancer* 1985; 56: 717-718.
7. Vucenik I., Shamsuddin A.M. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic. *J. Nutr.* 2003; 133: 3778-3784.
8. Muraoka S., Miura T. Inhibition of xanthine oxidase by phytic acid and its anti-oxidative action. *Life Sci.* 2004; 74: 1691-1700.
9. Liao J., Seril D.N., Yang A.L., Lu G.G., Yang G.G. Inhibition of chronic ulcerative colitis associated adenocarcinoma development in mice by inositol compounds. *Carcinogenesis* 2007; 28: 446-454.
10. Gulcin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci.* 2006; 78: 803-811.
11. Graf E., Mahoney J.R., Bryant R.G., Eaton J.W. Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 3620-3624.
12. Graf E., Empson K.L., Eaton J.W. Phytic acid. A natural antioxidant. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 11647-11650.
13. Rimbach G., Pallauf J. Phytic acid inhibits free radical formation *in vitro* but does not affect liver oxidant or antioxidant status in growing rats. *J. Nutr.* 1998; 128: 1950-1955.
14. Midorikawa K., Murata M., Oikawa S., Hiraku Y., Kawanishi S. Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 288: 552-557.
15. Phillippy B.Q., Graf E. Antioxidant functions of inositol 1,2,3-trisphosphate and inositol 1,2,3,6-tetrakisphosphate. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22: 939-946.
16. Miyamoto S., Kuwata G., Imai M., Nagao A., Terao J. Protective effect of phytic acid hydrolysis products on iron-induced lipid peroxidation of liposomal membranes. *Lipids* 2000; 35: 1411-1413.
17. Bucher J.R., Tien M., Aust S.D. The requirement for ferric in the initiation of lipid peroxidation by chelated ferrous iron. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983; 111: 777-784.
18. Minotti G., Aust S.D. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 1098-1104.
19. Minotti G., Aust S.D. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids* 1992; 27: 219-226.
20. Girotti A.W. Mechanisms of lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 1985; 1: 87-95.
21. Spitteller P., Spitteller G. Strong dependence of the lipid peroxidation product spectrum whether Fe<sup>2+</sup>/O<sub>2</sub> in used as oxidant. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1392: 23-40.
22. Kosugi H., Kikugawa K. Potential thiobarbituric acid- reactive substances in peroxidized lipids. *Free Radic. Biol. Med.* 1989; 7: 205-207.
23. Zajdel A., Parfiniewicz B., Wilczok A., Węglarz L., Dzierżewicz Z. Wpływ kwasu fitynowego na zawartość wtórnych produktów peroksydacji lipidów w komórkach nowotworowych jelita grubego linii Caco-2. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2006; 60: 516-522.
24. Ramasamy S., Parthasarathy S., Harrison D.G. Regulation of endothelial nitric oxide synthase gene expression by oxidized linoleic acid. *J. Lipid Res.* 1998; 39: 268-276.
25. Empson K.L., Labuza T.P., Graf E. Phytic acid as a food antioxidant. *J. Food Sci.* 1991; 56: 560-563.
26. Lee B.J., Hendricks D.G. Metal-catalyzed oxidation of ascorbate, deoxyribose and linoleic acid as affected by phytic acid in a model system. *J. Food Sci.* 1997; 62: 935-938.
27. Nielsen N.S., Petersen A., Meyer A.S., Timm-Heinrich M., Jacobsen Ch. Effects of lactoferrin, phytic acid, and EDTA on oxidation in two food emulsions enriched with long-chain polyunsaturated fatty acids. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 7690-7699.
28. Ahn D.U., Olson D.G., Jo C., Love J., Jin S.K. Volatiles production and lipid oxidation on irradiated cooked sausage as related to packaging and storage. *J. Food Sci.* 1999, 64, 226-229.
29. Park H.R., Ahn H.J., Kim J.H. i wsp. Effects of irradiated phytic acid on antioxidant and color stability in meat models. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 2572-2576.
30. Garcia-Casal M.N., Leets I., Layrisse M.  $\beta$ -carotene and inhibitors of iron absorption modify iron uptake by Caco-2 cells. *J. Nutr.* 2000; 130: 5-9.
31. Lee H.J., Lee S.A., Choi H. Dietary administration of inositol and/or inositol-6-phosphate prevents chemically-induced rat hepatocarcinogenesis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2005; 6: 41-47.
32. Hassan S.A., Rizk M.Z., El-Sharkawi F., Badary O., Kadry M.O. The possible synergistic role of phytic acid and catechin in ameliorating the deteriorative biochemical effects induced by carbon tetrachloride in rats. *J. Appl. Sci. Res.* 2007; 3: 1449-1459.
33. Kitamura Y., Nishikawa A., Nakamura H. i wsp. Effects of N-acetylcysteine, quercetin, and phytic acid on spontaneous hepatic and renal lesions in LEC rats. *Toxicol. Pathol.* 2005; 33: 584-592.
34. Rimbach G., Pallauf J. Effect of dietary phytate on magnesium bioavailability and liver oxidant status in growing rats. *Food Chem. Toxicol.* 1999; 37: 37-45.