# VYSOKÉ DÁVKY VITAMÍNU A POČAS EMBRYOGENÉZY A POSTNATÁLNY ANTIOXIDAČNÝ STATUS V PEČENI POTKANA

**PETER PATLEVIČ[a], JANKA VAŠKOVÁ[a], LADISLAV VAŠKO[a], JURAJ GUZY[a] a DARINA KLUCHOVÁ[b]**

*[a] Ústav lekárskej chémie, biochémie, klinickej biochémie a LABMED a.s., Lekárska Fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Trieda SNP č. 1, 040 66 Košice, [b] Ústav anatómie, Lekárska Fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Šrobárová 2, 040 80 Košice ppatlevic@gmail.com*

Došlo 28.1.10, prepracované 28.4.10, prijaté 13.5.10.

Kľúčové slová: vitamín A, hypervitaminóza, pečeň, antioxidačné enzýmy, postnatálny vývoj

## Úvod

Vitamín A (all-trans-retinol) (Schéma 1) zasahuje v živočíšnom organizme do látkovej premeny na rôznych miestach. Uplatňuje sa predovšetkým v biochémii zrakového vnemu a pri biosyntéze bielkovín, je esenciálnym elementom pre zdravý vývin embrya, pre diferenciáciu a proliferáciu bunkových línii a pre aktiváciu a transkripciu génov[1]. Vysoké dávky retinolu môžu spôsobiť zvýšené pečeňové rezervy vitamínu A až hypervitaminózu (akútna alebo chronická intoxikácia vitamínom A), ktorá má za následok bolesti hlavy, nevoľnosť, hepatomegáliu, hyperlipidémiu, v extrémnych prípadoch zväčšenie sleziny, poruchy videnia, kómu až smrť. Hypervitaminóza A je zvlášť nebezpečná pre gravidné ženy, pretože môže spôsobiť rôzne malformácie vyvíjajúceho sa plodu[2,3].

Retinoidy sú všeobecne regulátormi rastu a diferenciácie mnohých typov buniek. Bolo zistené, že účinok retinoidov je sprostredkovaný nukleárnymi receptormi patriacimi k receptorom pre steroidné hormóny. Tieto receptory, nazývané receptory kyseliny retinovej (RARs) a retinoid X receptory (RXRs) sa viažu na rozdielne responzívne elementy a aktivujú viaceré gény potrebné k diferenciácii a proliferácii epiteliálnych tkanív[4]. Vytvorený komplex kyseliny retinovej s receptorom sa viaže na RA responzívny element (RARE), ktorý sa obyčajne nachádza v oblasti promótoru daného génu a moduluje jeho transkripciu. To má mimoriadne dôležité fyziologické následky pre bunku ako aj celý organizmus, obzvlášť počas embryonálneho vývoja[5]. Veľa buniek obsahuje ako hlavný zdroj retinoidov retinol a je známe, že práve tento aktívny metabolit retinolu, kyselina retinová vzniká jeho tkanivovo špecifickou oxidáciou[6].

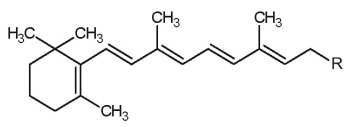



Schéma 1. **Štruktúrny vzorec all-trans-retinolu (R= $CH_2$-OH), retinalu (R= CH=0), kyseliny retinovej (R= COOH)**

Doporučená denná dávka retinolu je pre dospelých 1000 RE (5000 UI, 1 UI = 0,2 μg retinolu = 0,2 RE), pre ženy je to 800 RE (4000 UI). V čase gravidity, pokiaľ je matka zdravá, stačí zvýšiť minimálnu dennú dávku retinolu o 200 RE (1000 UI). Chronická toxicita retinolu sa môže prejaviť už pri denných dávkach vyšších ako 7500 až 9000 RE (cit.[7]). Podávanie 10 mg $kg^{-1}$ živej váhy (ž.v.) vitamínu A samiciam potkana z rodu Wistar na 8. až 10. deň gravidity dokázala, že táto perióda je veľmi citlivá pre vznik rôznych malformácii embrya a je vhodná pre štúdium účinkov vitamínu A počas embryogenézy, pretože mortalita narodených mláďat bola nízka, pričom tá istá dávka vitamínu A podávaná na 11. až 13. deň gravidity samice spôsobila úhyn všetkých mláďat do štyroch dní od narodenia[8].

Voľný retinol je chemicky nestály. Človek nemá schopnosť syntetizovať vitamín A a preto ho získava z potravy živočíšneho (mlieko, vajcia, ryby) a rastlinného pôvodu (β-karotén). Karotenoidy nespôsobujú hypervitaminózu A, pretože konverzia provitamínu A zo skupiny karotenoidov je limitovaná[9].

Na druhej strane vitamín A, β-karotén, prekurzor vitamínu A patria medzi najdôležitejšie prirodzené antioxidanty, pomocou ktorých sa organizmus bráni účinkom voľných kyslíkových radikálov. Voľné radikály majú jeden alebo viac nespárených elektrónov v atómovom alebo v molekulovom orbitáli. Reakciou voľných radikálov s oxidovanou látkou sa tvoria metabolity, ktoré môžu byť často reaktívnejšie a teda aj škodlivejšie ako pôvodný radikál[10]. Vitamíny sú schopné plniť úlohu antioxidantov len vtedy, ak je hladina vitamínov v tele na fyziologickej úrovni a nedôjde k ich predávkovaniu alebo k ich nedostatku. Takéto zmeny množstva vitamínov v tele jedinca môžu vplývať na zmenu aktivity iných antioxidantov[11]. Arruda a spol. (2008) zistili, že pri nedostatku vitamínu A dochádza k zníženej aktivite pečeňovej katalázy, glutatión peroxidázy a glutation-S-transferázy[12]. Za normálnych okolností je v pečeňových lipocytoch až 75 % celkových zásob organizmu retinolu[13].

Vzhľadom na popísané účinky retinolu a pozorovaný synergizmus s hladinami endogénnych antioxidantov bolo cieľom práce zistiť možný vplyv vitamínu A podávaného počas embryogenézy potkana na enzýmovú aktivitu superoxiddizmutázy (SOD), enzýmov glutatión peroxidázy (GPx), glutatión reduktázy (GR) a na hladinu ich substrátu, redukovaného glutatiónu (GSH) v pečeni v rôznych obdobiach postnatálneho vývoja.

## Experimentálna časť

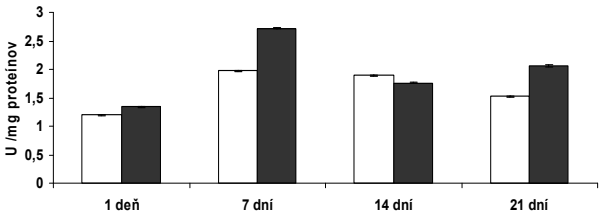
Na štúdium danej problematiky sme použili pečene potkanov z kmeňa Wistar oboch pohlaví v rôznych časových periódach postnatálneho vývoja, ktoré boli chované v štandardných podmienkach pod dohľadom etickej komisie LF UPJŠ pri dodržaní ustanovení Zákona NR SR o ochrane zvierat zo dňa 4.5.1995, Zbierky Zákona č. 115/1995 a Zákona č. 231/1998 a zároveň boli dodržané odporúčania Rady európskych spoločností č. 86/609/EEC. Experiment bol vykonaný so súhlasom Štátnej veterinárnej a potravinovej správy Slovenskej republiky č. 1696/07-221a. Potkany mali voľný prístup k potrave a pitnej vode. Retinol (Sigma, R7632) bol podávaný *per os* v množstve 10 mg $kg^{-1}$ ž.v. na 8., 9., a 10. deň gravidity samice. V obdobiach 1., 7., 14. a 21. deň po narodení sme zvieratá anestetizovali intraperitoneálne Thiopentalom v dávke 30 mg $kg^{-1}$ hmotnosti zvieraťa. Pečene boli odobraté do izolačného média, ktoré obsahovalo 250 mM sacharózy, 10 mM Tris a 1 mM EDTA, pH 7,8 a následne z nich boli mitochondrie izolované podľa metódy Johnson a spol.[14]. Homogenát pečene pripravený v homogenizačnej súprave teflón-sklo sme centrifugovali za stáleho chladenia pri teplote 4 °C pri otáčkach 3000 rpm 10 min, čím sme odstránili bunkovú drvinu a jadrá. Získaný supernatant sme centrifugovali pri 14 000 rpm 10 min. Sediment mitochondrií sme premyli a opäť centrifugovali, toto sme opakovali 2×. Sedimentované mitochondrie sme nakoniec resuspendovali tak, aby bol obsah bielkovín 10 mg na 0,1 ml suspenzie. Aktivitu GR (E.C.1.6.4.2) sme merali upravenou metódou pôvodne popísanou Carlbergom a Mannervikom[15], ktorá je založená na princípe merania oxidácie NADPH pri 340 nm. Reakčná zmes obsahovala 0,1 M fosfátový pufor (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,63 mM NADPH a 0,15 mM GSSG. GPx aktivitu (E.C.1.11.1.9) sme stanovili podľa metódy Flohe a Gunzler[16] pri 340 nm. Reakčná zmes obsahovala 50 mM fosfátový pufor (pH 7,1), 3,6 mM GSH, 3,6 mM azid sodný, 1 IU $ml^{-1}$ glutatión reduktázy, 0,2 mM NADPH a 1,2 mM $H_2O_2$. Aktivitu SOD (E.C.1.15.1.1) sme merali prostredníctvom SOD-Assay Kit-WST (Fluka). Redukovaný glutation (GSH) sme stanovili modifikovanou metódou podľa Floreani a spol.[17] s použitím Ellmanovho činidla [5,5'-pyridín-bis (2-nitrobenzoová kyselina)]. Koncentrácia proteínov bola stanovená podľa Bradfordovej[18] a je vyjadrená ako miligram proteínu na mililiter homogenátu. Ako štandardu sme využili hovädzí sérový albumín.

Všetky merania boli prevedené na spektrofotometri Camspec M501 UV/VIS. Výsledky predstavujú priemer hodnôt ± S.E.M. troch nezávislých meraní. Štatistická významnosť bola stanovená t-testom pri $P < 0,05$.

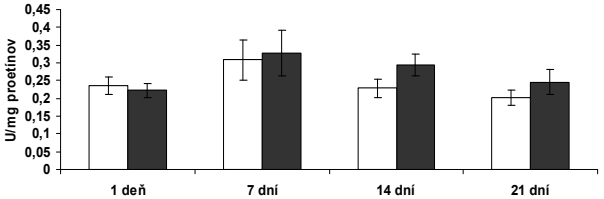
## Výsledky a diskusia

V práci sme skúmali, či retinol podávaný gravidným samiciam potkana vo vysokých dávkach ovplyvní endogénnu antioxidačnú kapacitu v postnatálnom období. Retinoidy sú všeobecne regulátormi rastu a diferenciácie mnohých typov buniek[4], ale dôležitá je aj ich schopnosť zhášania vytvorených voľných kyslíkových radikálov, čím eliminujú ich škodlivý vplyv na organizmus. Vzhľadom na to, že zmeny množstva vitamínov v tele jedinca môžu vplývať na zmenu aktivity iných antioxidantov, sledovali sme enzymatickú aktivitu SOD, GR a GPx a taktiež neenzýmového GSH v pečeňových mitochondriách v týchto časových horizontoch: 1 deň, 7 dní, 14 dní a 21 dní po narodení. Najvyššiu aktivitu SOD (obr. 1) sme zaznamenali v experimentálnej skupine na 7. deň po narodení a táto hodnota predstavovala signifikantný rozdiel oproti kontrolnej skupine. V ostatných časových obdobiach aktivita SOD vykazovala rovnako signifikantné rozdiely oproti porovnávanej kontrolnej skupine. Najnižšie hodnoty aktivity SOD sme zaznamenali v 1. deň po narodení v kontrolnej aj v experimentálnej skupine. Pri porovnaní jednotlivých časových období sme zistili, že SOD aktivita experimentálnej skupiny je výrazne zvýšená v 7. deň života oproti 1. dňu. Aktivita SOD v pokusných vzorkách odobratých na 14. a 21. deň má klesajúci charakter. Oproti kontrolným skupinám má však stále štatisticky významné zvýšenie. SOD je esenciálnym enzýmom pri detoxikácii superoxidových radikálov na peroxidy. Zvýšená aktivita SOD môže viesť k zvýšenej tvorbe peroxidov, ich kumulácii a tým k indukcii oxidačného stresu[19].

Obdobný trend bol zistený aj v aktivite GPx (obr. 2). GPx nešpecificky katalyzuje premenu peroxidov na zod-




Obr. 1. **Biologická aktivita SOD [U $mg^{-1}$ proteínov] počas postnatálneho vývoja potkana;** **P* <0,05, ☐ kontrolná skupina, ■ experimentálna skupina




Obr. 2. **Biologická aktivita GPx [U $mg^{-1}$ proteínov] počas postnatálneho vývoja potkana;** **P* < 0,05, ☐ kontrolná skupina, ■ experimentálna skupina

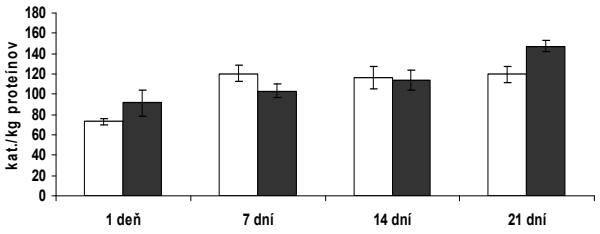
povedajúce alkoholy a vodu, čím zabraňuje tvorbe ďalších reaktívnych kyslíkových radikálov (ROS) vznikajúcich rozpadom peroxidov. Zistená zvýšená aktivita GPx môže byť teda dôsledkom zvýšenej produkcie reaktívnych kyslíkových radikálov. Signifikantné zvýšenie aktivity GPx v porovnaní s kontrolou sme zaznamenali na 14. deň postnatálneho vývoja. Aktivita GPx v pokusných vzorkách odobratých v 1. a 7. deň sa zvyšovala, avšak oproti kontrolným skupinám sú to nesignifikantné rozdiely. GPx aktivita v experimentálnej skupine v 7. deň postnatálneho vývoja mala oproti 1. dňu najvyššiu aktivitu, v ostaných sledovaných časových obdobiach experimentálnej skupiny mala GPx aktivita klesajúci charakter.

Simultánne s pozorovaným zvýšením aktivity GPx došlo aj k zvýšeniu aktivity GR. Aktivita GR v pokusných vzorkách sa zvyšovala od 1. dňa až po 21. postnatálny deň, pričom v 1. a 21. deň postnatálneho vývoja sme zaznamenali signifikantné zvýšenie oproti kontrolným skupinám (obr. 3). Aktivita GR bola však oproti kontrole na 7. deň signifikantne nižšia. Pri štúdiu ontogenézy aktivity GR a GPx sa zistilo, že biologické aktivity týchto enzýmov sa zvyšovali od prvého dňa po narodení a GR aktivita dosiahla na 7. deň až 50% hodnoty aktivity dospelého jedinca[20].

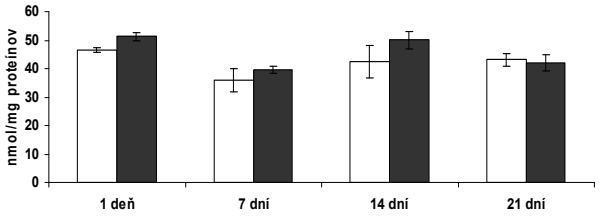
GPx redukuje peroxidy prostredníctvom GSH, ktorý sa oxiduje, pričom aktivitou GR je oxidovaný glutatión spätne redukovaný. Synergizmus týchto enzýmov odráža aj ich aktivita. Významným faktorom pri sledovaní antioxidačnej defenzívy je výrazny pokles hladiny GSH, ktorá indikuje oxidačný stres v čase, kedy ešte iné biochemické zmeny nie sú detekovateľné[21]. Zmeny v hladinách GSH u experimentálnych skupín v porovnaní s kontrolami však preukazujú signifikantné rozdiely len v 1. deň. Obr. 4 poukazuje na nesignifikantné zmeny v hodnotách hladín GSH v ostatných troch sledovaných časových obdobiach postnatálneho vývoja potkana pri porovnávaní experimentálnych a kontrolných skupín. Je však zrejmé, že na 7. deň došlo k poklesu hladín GSH.

Zvýšenie aktivity SOD, obzvlášť na 7. deň, odráža zvýšenú tvorbu ROS. Bezprostredne to nemusí byť dôsledkom prijímaných vysokých dávok vitamínu A gravidnými samicami, pretože rovnaká tendencia zvýšenia a následného poklesu v aktivitách enzýmov bola pozorovaná aj u kontrolných zvierat. Aktivita GPx a GR však predstavuje dostatočnú defenzívnu odozvu na tvorbu ROS, pretože nedochádza k vyčerpaniu hladín GSH.

V pokusoch *in vitro* bolo zistené, že u kultivovaných pečeňových lipocytoch dochádza medzi 4.–7. dňom k strate zásob retinolu dehydrogenáciou na retinal a ďalšou oxidáciou na kyselinu retinovú[22]. Je teda pravdepodobné, že na 7. deň dochádza k aktivácii pečeňových lipocytov a konverzii retinolu na oxidovaný produkt – kyselinu retinovú.




Obr. 3. **Biologická aktivita GR [kat. kg$^{-1}$ proteínov] počas postnatálneho vývoja potkana;** **P* < 0,05, ☐ kontrolná skupina, ■ experimentálna skupina




Obr. 4. **Celkový obsah GSH [nmol mg$^{-1}$ proteínov] počas postnatálneho vývoja potkana;** **P* < 0,05, ☐ kontrolná skupina, ■ experimentálna skupina

## Záver

Vitamín A, retinol je veľmi dôležitý počas prenatálneho a postnatálneho vývoja jedinca. Významná zásoba retinolu je v pečeni, kde sa metabolizuje a postupne sa dostáva do plazmy naviazaný na špecifické proteínové prenášače. Výsledky našej štúdie dokázali, že hypervitaminóza A počas gravidity samice nemá výrazný vplyv na antioxidačný stav mláďat počas postnatálneho vývoja.

*Táto štúdia bola podporená VEGA grantom 1/0643/08.*

LITERATÚRA

1. Castillo V., Giacomini D., Páez-Pereda M., Stalla J., Labeur M., Theodoropoulou M., Holsboer F., Grossman A. B., Stalla G. K., Arzt E.: Endocrinology *147*, 4438 (2006).
2. Colakoğlu N., Kükner A.: J. Mol. Histol. *35*, 823 (2004).
3. Duester G.: Birth Defects Res., C *81*, 84 (2007).
4. Wicke C., Halliday B., Allen D., Roche N. S., Scheuenstuhl H., Spencer M. M., Roberts A. B., Hunt T. K.: Arch. Surg. *135*, 1265 (2000).
5. Demary K., Wong L., Liou J. S., Faller D. V., Spanjaard R. A.: Endocrinology *142*, 2600 (2001).
6. Tryggvason K., Romert A., Eriksson U.: J. Biol. Chem. *276*, 19253 (2001).
7. Bender D. A.: *Nutritional Biochemistry of The Vita-*

*mins (2)*. Cambridge University Press, Edinburgh 2003.
8. Holson R. R., Gazzara R. A., Ferguson S. A., Ali S. F., Laborde J. B., Adam J.: Neurotoxicol. Teratol. *19*, 335 (1997).
9. Velíšek J.: *Chemie potravin*. Ossis, Tábor 2002.
10. Dlugošová K., Pšenáková I.: Nova Biotechnologica *1*, 185 (2004).
11. Ďuračková Z.: *Voľné radikály a antioxidanty v medicíne (I)*. Slovak Academic Press, Bratislava 1998.
12. Arruda S., Siqueira E., Valência F.: Nutrition *25*, 472 (2008).
13. Geerts A.: Semin. Liver Dis. *21*, 311 (2001).
14. Johnson D., Lardy H.: Methods Enzymol. *10*, 94 (1967).
15. Carlberg I., Mannervik B.: Methods Enzymol. *113*, 484 (1985).
16. Flohe L., Gunzler W. A.: Methods Enzymol. *105*,114 (1984).
17. Floreani M., Petrone M., Debetto P., Palatini A.: Free Radical Res. *26*, 449 (1997).
18. Bradford M.: Anal. Biochem. *72*, 248 (1976).
19. Hervouet E., Simonnet H., Godinot C.: Biochimie *89*, 1080 (2007).
20. Elbarbry F., Alcorn J.: Res. Vet. Sci. *87*, 242 (2009).
21. Schulz J. B., Lindenau J., Seyfried J., Dichgans J.: Eur. J. Biochem. *267*, 4904 (2000)
22. Radaeva S., Wang L., Radaev S., Jeong W. I., Park O., Gao B.: Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. *293*, G809 (2007).

**P. Patlevič[a], J. Vašková[a], L. Vaško[a], J. Guzy[a], and D. Kluchová[b]** *([a] Department of Chemistry, Biochemistry and Medicinal Biochemistry and Labmed Co., [b] Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Pavol Jozef Šafárik University, Košice. Slovakia):* **High Doses of Vitamin A in Embryogenesis and Postnatal Antioxidant Status of Rat Liver**

The aim of this study was to assess the antioxidant status of rat liver in various periods of postnatal development after affecting the pregnancy by high doses of vitamin A. Wistar rats of both sexes were used. Vitamin A (10 mg per kg of body weight) was administered to rats in gestation on days 8 through 10 per os. Biological activities of antioxidant enzymes were measured spectrophotometrically in experimental groups and controls. Superoxide dismutase showed a significant activity increase on postnatal day 7 in the experimental group. The glutathione peroxidase activity was highest on postnatal day 7 and showed a significant increase on day 14 in the experimental group. Glutathione reductase activity significantly increased only on days 1 and 21 and decreased on day 7. The glutathione content remained relatively constant in both groups although a slight depletion on day 7, in parallel to enzyme activities, suggested a higher level of oxidative stress. Our results demonstrate that hypervitaminosis A in pregnancy does not influence the postnatal antioxidant status.

Děkan přírodovědecké fakulty UK vypisuje konkurs na přijetí do

**doktorského studia**

v následujících oborech: analytická chemie, anorganická chemie, biochemie, fyzikální chemie, makromolekulární chemie, modelování chemických vlastností nano- a biostruktur, organická chemie a vzdělávání v chemii.
Studium bude zahájeno 1. 10. 2011. Podmínkou přijetí je absolvování VŠ ve shodném nebo blízkém studijním oboru. Přihlášky a podrobné informace jsou na adrese: PřF UK, oddělení doktorského studia, Albertov 6, 128 43 Praha 2, tel.. 221951162, 221951163. Přihlášky se přijímají do 30. 4. 2011.