

PALMITYNIAN RETINYLU A REDUKCJA STRESU OKSYDACYJNEGO U SZCZURÓW

RETINYL PALMITATE AND OXIDATIVE STRESS REDUCTION IN RATS

Anna Gronowska-Senger, Katarzyna Burzykowska, Magdalena Przepiórka

Katedra Żywienia Człowieka, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Słowa kluczowe: *palmitynian retinyłu, stres oksydacyjny, nadtlenki lipidowe, potencjał antyoksydacyjny*

Key words: *retinyl palmitate, oxidative stress, lipid peroxides, antioxidant potential*

STRESZCZENIE

Celem pracy było zbadanie czy palmitynian retinyłu redukuje stres oksydacyjny wywołany wysiłkiem fizycznym. Badania przeprowadzono na rosnących szczurach samcach rasy Wistar, które przez 10 dni biegały na bieżni z prędkością przesuwu 20 m/min. Szczurom podawano palmitynian retinyłu w ilości 7,5, 15 lub 60 µg dziennie na zwierzę. Po tym okresie w osoczu oznaczano poziom retinolu, nadtlenki lipidowe i potencjał antyoksydacyjny oraz estry retinyłu w wątrobie. Stwierdzono, że palmitynian retinyłu redukuje stres oksydacyjny wywołany wysiłkiem fizycznym, a efektywność tego procesu nie zależała od dawki podanego palmitynianu.

ABSTRACT

The effect of retinyl palmitate dose on oxidative stress reduction induced by physical activity was the aim of study. The experiment was carried out on Wistar strain males rats, which were trained by running on treadmill with speed 20 m/min. during 10 days. The rats were administered with 7,5, 15 or 60 µg of retinyl palmitate daily to each one. The level of retinol, lipid peroxides, antioxidant potential in serum and retinyl esters in liver were measured. It was shown that retinyl palmitate reduced oxidative stress, independently to its daily dose.

WSTĘP

Poza dobrze poznaną rolę witaminy A w procesie widzenia, wzroście i rozwoju organizmu, różnicowaniu komórek [4, 25], posiada ona też właściwości przeciwutleniające. Właściwości te polegają na wychwytywaniu wolnych rodników nadtlenkowych w tkankach, wygaszaniu tlenu singletowego [5, 12]. Ważną właściwością antyoksydacyjną witaminy A jest ochrona LDL przed utlenianiem i aterogennym modyfikacjom apo-β-lipoprotein [2, 13, 17]. All trans retinol wykazuje wyższą aktywność przeciwutleniającą w porównaniu z naturalnymi retinoidami w liposomach i błonach biologicznych [13].

Stres oksydacyjny przyczynia się do rozwoju wielu chorób w organizmie, m.in. niedokrwiennej choroby serca, nadciśnienia, różnych nowotworów, a z dostępnych danych wynika, że witamina A zmniejsza ich ryzyko [8, 14, 16, 18].

Jednocześnie nadmierna suplementacja witaminą A wywołuje negatywne efekty zdrowotne, przyczyniając

się do szybszego rozwoju różnych schorzeń [22, 23]. Dwuznaczność tych obserwacji wpłynęła na podjęcie niniejszych badań, których celem było określenie czy zróżnicowane dawki palmitynianu retinyłu redukuje stres oksydacyjny wywołany wysiłkiem fizycznym.

MATERIAŁ I METODY

Badanie przeprowadzono na grupie 49 samców szczurów rasy Wistar o początkowej masie ciała 77,3 g ± 5,3 g. Zwierzęta umieszczono pojedynczo w pół-metabolicznych klatkach w pomieszczeniu wentylowanym o stałej temperaturze 24°C i 12 godzinnym cyklu oświetleniowym. Prowadzono kontrolę masy ciała co drugi dzień oraz codziennie spożycia diety. Badania wykonano za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej.

W okresie adaptacyjnym (3 dni) zwierzętom podawano *ad libitum* wodę oraz dietę bez witaminy A [1, 7], której skład zawiera tabela 1. Po zakończeniu tego okresu cztery szczury poddano narkozie i wypreparo-

Adres do korespondencji: Anna Gronowska-Senger, Zakład Oceny Żywienia, Katedra Żywienia Człowieka, SGGW, ul. Nowoursynowska 159C, 02-776 Warszawa, tel./fax: 22 59 37 123, e-mail: anna_gronowska_senger@sggw.pl

wano wątroby dla oznaczeń wyjściowych poziomów witaminy A. Pozostałe zwierzęta podzielono na grupy zgodnie z układem podanym w tabeli 2.

Tabela 1. Skład diety doświadczalnej
Experimental diet composition

| Składnik | g/100 g |
|----------------------|---------|
| Skrobia pszenna | 53 |
| Kazeina | 20 |
| Sacharoza | 10 |
| Smalec | 7 |
| Skrobia ziemniaczana | 5 |
| Mieszanka mineralna | 3,5 |
| Mieszanka witaminowa | 1 |
| L-metionina | 0,3 |
| Cholina | 0,25 |

Tabela 2. Układ doświadczenia
Experimental arrangement

| Grupa | Palmitynian retinyli (μg) |
|-------------------|--|
| K B | - |
| A ₁ B | 7,5 |
| A ₂ B | 15,0 |
| A ₃ B | 60,0 |
| K _n B | - |
| A _{1n} B | 7,5 |
| A _{2n} B | 15,0 |
| A _{3n} B | 60,0 |

Grupy kontrolne liczyły po 5 sztuk, pozostałe po 6 sztuk. Zwierzęta biegały codziennie na bieżni o prędkości przesuwu 20 m/min przez 15 minut w okresie 10 dni. Zwierzętom (poza kontrolnymi) 20 minut przed biegiem podawano palmitynian retinyli o odpowiednim stężeniu wynikającym z układu doświadczenia (tabela 2). Po 10 dniach zwierzęta poddano narkozie, pobrano krew oraz wypreparowano wątroby. Krew wirowano przez 15 minut przy 4000 obrotów/minutę, a uzyskane osocze zamrażano do dalszych analiz. Wątroby przemywano roztworem soli fizjologicznej i zamrażano.

W osoczu oznaczano poziom nadtlenków lipidowych metodą TBARS [21], potencjał antyoksydacyjny metodą ABTS [3] oraz zawartość retinolu metodą HPLC-UV [28]. Zawartość estrów retinyli w wątrobach oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej [28].

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej korzystając z programu Statgraphics Plus 5.1. Dokonano analizy wariancji jednoczynnikowej (ANOVA), przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

Średni przyrost masy ciała nie wykazał istotnych różnic w obrębie grup otrzymujących różne dawki palmitynianu retinyli, natomiast istotną statystycznie róż-

nicę $p = 0,04$ stwierdzono między grupami biegającymi i niebiegającymi (tabela 3), co nie wynikało ze spożycia diety, która była podobna w obu grupach i niezależna od dawki witaminy A, a raczej z przyrostu masy mięśniowej. Podobne obserwacje poczynili Yamamoto i wsp. [29], badając zależność między aktywnością fizyczną a potencjałem przeciwutleniającym szczurów, przy czym czas trwania wysiłku fizycznego był znacznie dłuższy i wynosił 3 tygodnie.

Tabela 3. Średni przyrost masy ciała i średnie spożycie diety przez szczury
Average rate of body weight and diet intake by rats

| Grupa | Przyrost masy ciała (g) | Spożycie diety (g) |
|-------------------|-------------------------|--------------------|
| K B | 78,77 | 14,4 \pm 2,67 |
| A ₁ B | 59,10 | 14,1 \pm 2,84 |
| A ₂ B | 60,45 | 14,4 \pm 2,47 |
| A ₃ B | 66,94 | 15,3 \pm 2,58 |
| K _n B | 72,28 | 13,9 \pm 2,94 |
| A _{1n} B | 60,10 | 14,5 \pm 2,34 |
| A _{2n} B | 62,68 | 14,9 \pm 1,85 |
| A _{3n} B | 57,60 | 14,2 \pm 2,17 |

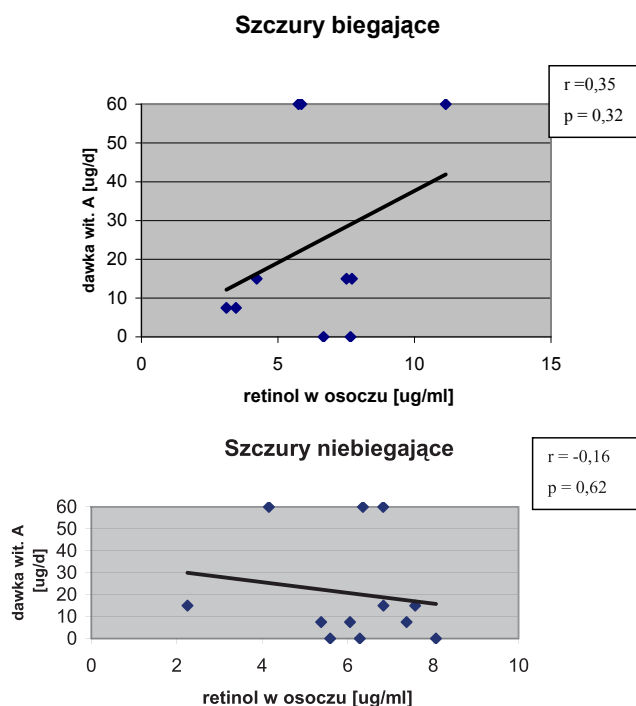
W badaniu własnym stwierdzono istotnie niższe masy wątrób w odniesieniu do całkowitej masy ciała szczurów grup biegających, w porównaniu do grup zwierząt niebiegających (tabela 4).

Tabela 4. Zależność między masą wątroby (w) a całkowitą masą ciała (m.c.)
Interrelation between liver weight (w) and total body mass (m.c.) in rats

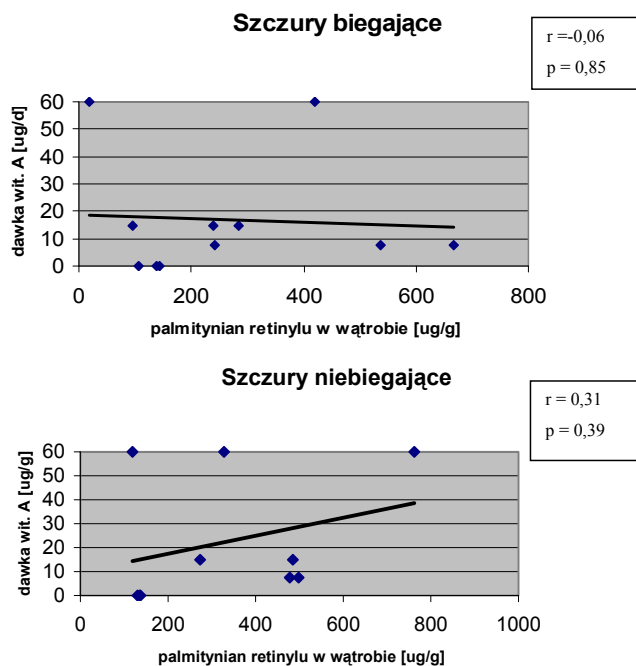
| Grupa | ANOVA, $\alpha = 0,05$ |
|-------------------------------|------------------------|
| K B w m.c. | $p = 0,00$ |
| A ₁ B w m.c. | $p = 0,02$ |
| A ₂ B w m.c. | $p = 0,03$ |
| A ₃ B w m.c. | $p = 0,01$ |

W grupach biegających wraz ze wzrostem dawki palmitynianu retinyli obniżał się poziom retinolu w osoczu, w przeciwieństwie do grup niebiegających, gdzie wystąpiła tendencja odwrotna (rycina 1). Podobne zależności zaobserwowano dla estrów retinyli w wątrobie (rycina 2), co wskazuje na uwalnianie ich z tego narządu i wykorzystywanie do obrony organizmu przed wolnymi rodnikami. Potwierdzają to uzyskane wartości potencjału antyoksydacyjnego oraz nadtlenków lipidowych w osoczu krwi (tabela 5), przy czym nie stwierdzono istotnych zależności między potencjałem

antyoksydacyjnym a dawką palmitynianu retinyłu, o czym świadczy dodatni współczynnik korelacji $r=0,23$, $p=0,28$ grupy biegające, $r=0,03$, $p=0,89$ grupy niebiegające.



Ryc. 1. Zależność między dawką palmitynianu retinyłu a poziomem retinolu w osoczu krwi szczurów z grup biegających i niebiegających
Interrelation between retinyl palmitate dose and plasma retinol level in trained and untrained rats



Ryc. 2. Zależność między dawką palmitynianu retinyłu a jego zawartością w wątrobie szczurów z grup biegających i niebiegających.
Interrelation between retinyl palmitate dose and its liver content in trained and untrained rats

Tabela 5. Potencjał antyoksydacyjny oraz poziom nadtlenków lipidowych w osoczu krwi szczurów
Antioxidant potential and lipid peroxides in rats plasma

| Grupa | Potencjał antyoksydacyjny $\mu\text{M Troloxu}/\text{cm}^3$ | Nadtlenki lipidowe $\mu\text{M TEP}/\text{cm}^3$ |
|-------------------|--|---|
| K B | $120,1 \pm 3,2$ | $3,3 \pm 0,8$ |
| A ₁ B | $125,8 \pm 4,1$ | $19,3 \pm 1,4$ |
| A ₂ B | $126,2 \pm 3,8$ | $12,7 \pm 2,5$ |
| A ₃ B | $125,2 \pm 4,3$ | $8,9 \pm 1,4$ |
| K _n B | $120,7 \pm 4,5$ | $5,4 \pm 0,9$ |
| A _{1n} B | $120,5 \pm 3,2$ | $10,8 \pm 1,1$ |
| A _{2n} B | $120,6 \pm 3,4$ | $9,3 \pm 3,8$ |
| A _{3n} B | $121,2 \pm 3,2$ | $9,0 \pm 4,9$ |

Rosnący potencjał przeciwutleniający osocza szczurów grup biegających dowodzi, iż wysiłek fizyczny generuje nadmiar wolnych rodników prowadząc do wzrostu ilości nadtlenków lipidowych. Malejąca wraz ze wzrostem dawki palmitynianu retinyłu ilość nadtlenków lipidowych świadczy o antyoksydacyjnym charakterze tej formy witaminy A i hamowaniu przez nią peroksydacji lipidów. Obserwacje te są zgodne z poczynionymi przez innych autorów [26, 27, 30], którzy stwierdzili znaczący wzrost utleniania lipidów w grupie szczurów poddanych wysiłkowi fizycznego w porównaniu do nietrenowanych. Ponadto witamina A obniżała peroksydację lipidów [31].

Również w badaniach na ludziach [6, 9, 11, 20] wykazano, że różne formy witaminy A posiadają aktywność antyoksydacyjną zmniejszającą stres oksydacyjny, a tym samym ryzyko wielu chorób chronicznych niezakaźnych [10, 14, 15, 19, 24]. Są też dane wskazujące, że wysokie dawki witaminy A [22, 23] powodują jej działanie prooksydacyjne. W badaniach własnych nie stwierdzono zależności między dawką palmitynianu retinyłu a efektywnością redukcji stresu oksydacyjnego.

WNIOSKI

Uzyskane w niniejszym badaniu dane pozwalają stwierdzić, że:

1. Wysiłek fizyczny indukował stres oksydacyjny, który powodował uwalnianie estrów retinyłu z wątroby i wzrost retinolu w osoczu krwi.
2. Palmitynian retinyłu redukował stres oksydacyjny, przy czym efektywność tego działania była niezależna od jego dawki.

PIŚMIENNICTWO

1. Baker H., Lindsey J., Weisbroth S.: The laboratory rat. Acad. Press, New York, London 1979.
2. Barber T., Borrás E., Torres L., García C., Cabezuelo F., Lloret A., Pallardó F.V., Viña J.R.: Vitamin A deficiency

- causes oxidative damage to liver mitochondria in rats. *Free Radical Biology & Medicine* 2000, 29, 1, 1–7.
3. *Bartosz G.*: Druga twarz tlenu. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
 4. *Bellovino D., Apreda M., Gragnoli S., Massimi M., Gaetani S.*: Vitamin A transport: in vitro models for the study of RBP secretion. *Molecular Aspects of Medicine* 2003, 24, 411–420.
 5. *Boileau T.W.M., Moore A.C., Erdman J.W.*: Carotenoids and Vitamin A. W: *Albanes D., Augè N., Azzi A., Bierenbaum M.L., Blumberg J.B., Boileau T.W.M., Erdman J. W., Giampaolo A., Halpner A.D., Handelman G.J., Hartman T.J., Hennekens Ch.H., Hendrich S., Kafatos A., Kramer-Stickland K., Lagiou P., Lands W.E.M., Landvik S., Levine M.A., Liebler D., Lin H-K., McVeban M., Meydan S.N., Mitton K.P., Moore A. C., Murphy P.A., Niki E., Noguelu N., Ōzer N.K., Packer L., Papas A.M., Parthasarathy S., Pawlosky R. J., Pryor W.A., Rumsey S., Solan N., Satanan N., Simopoulos A.P., Sokol R.J., Stone W.L., Tew B-Y, Trevithick J.R., Trichopoulou A., Wang G-J., Wang H-J., Wang Y., WatkinS t. R., Wu D., Xu X.*: Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. CRC Press, New York, Boca Raton, London, Washington 1999, 133.
 6. *Bonina F.P., Puglia C., Cimino F., Trombetta D., Triangli G., Roccazzello A.M., Insirello E., Rapisarda P., Saija A.*: Oxidative stress in handball players: effect of supplementation with a red orange extract. *Nutrition Research* 2005, 25, 917–924.
 7. *Brylińska J., Kwiatkowska Czapka.*: Zwierzęta laboratoryjne. Metody hodowli i doświadczeń. Towarzystwo Autorów Czapka Wydawców Prac Naukowych UNIVERSITA, Kraków 1996.
 8. *Czapska D., Ostrowska L., Karczewski J.*: Porównanie zawartości witamin antyoksydacyjnych w racjach pokarmowych kobiet chorych na nowotwór sutka i kobiet zdrowych (badania wstępne). *Żywnienie Człowieka i Metabolizm* 2001, XXVIII, 682–687.
 9. *Gago-Dominguez M., Jiang X., Castelao J.E.*: Lipid peroxidation and the protective effect of physical exercise on breast cancer, *Medical Hypotheses* 2007, 68, 1138–1143.
 10. *Golden T. R., Melov S.*: Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress and aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 2001, 122, 1577–1589.
 11. *Ilhan N., Kamanti A., Ozmerdivenli R., Ilhan N.*: Variable Effects of Exercise on Reduced Glutathione, Thiobarbituric Acid Reactive Substance Level, and Glucose Concentration. *Archives of Medical Reserch* 2004, 35, 294–300.
 12. *Jadhav S.J., Nimbalkar S.S., Kulkarni A.D., Madhavi D.L.*: Lipid Oxidation In Biological and Ford Systems. W: *Fennema O.R., Karel M., Sanderson G.W., Tannenbaum S.R., Walstra P., Whitaker J.R., Madhavi D. L., Deshpaude S.S., Salunkhe D.K.*: Food Antioxidants Technological. Toxicological and Health Perspectives, Marcel Dekker, Inc., New York 1996.
 13. *Keys S.A., Zimmerman W.*: Antioxidant Activity of Retinol, Glutathione and Taurine in Bovine Photoreceptor Cell Membranes. *Exp. Eye Res.* 1999, 68, 693–702.
 14. *Kim M.K., Ahn S.H., Lee-Kim Y.C.*: Relationship of serum α -tocopherol, carotenoids and retinol with the pisk of breast cancer. *Nutrition Research* 2001, 21, 797–809.
 15. *Kotur–Stevuljevic J., Memon L., Stefanovic A., Spasic S., Spasojevic–Kalimanovska V., Bogavac – Stanojevic N., Kalimanovska – Ostric D., Jelić - Ivanovic Z., Zunic G.*: Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *Clinical Biochemistry* 2007, 40, 181–187.
 16. *Kumagai Y., Pi J.B., Lee S., Sun G.F., Yamanushi T., Sagai M., Shimojo N.*: Serum antioxidant vitamins and risk of lung and stomach cancers in Shenyang, China. *Cancer Letters* 1998, 129, 145–149.
 17. *Livrea M.A., Tesoriere L., Bongiorno A., Pintaudi A.M., Ciaccio M. Riccio A.*: Contribution of vitamin A to the oxidatin resistance of human low density lipoproteins. *Free Radical Biology & Medicine* 1995, 18, 3, 401–409.
 18. *Manson J.E., Stampfer M.J., Willett W.C., Colditz G.A., Rosner B., Speizer F.E., Henckers C.H.*: A prospective study of antioxidant vitamins and incidence of coronary heart disease in women. *Circulation* 1997, 84, 546.
 19. *McCord J. M.*: The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *The American Journal of Medicine* 2000, 108, 652–659.
 20. *Morillas–Ruiz J.M., Villegas Garcia J.A., López F. J., Vidal – Guevara M.L., Zafrilla P.*: Effects of polyphenolic antioxidants on exercise – induced oxidative stress. *Clinical Nutrition* 2006, 25, 444 – 456.
 21. *Niemiec:* Wpływ dodatku kwasu L-askorbinowego na stan antyoksydacyjny odporności nieswoistej u szczurów eksponowanych na promieniowanie UV i IR. Praca doktorska wykonana w Katedrze Żywnienia Zwierząt na Wydziale Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, 2004.
 22. *Omenn G.S., Goodman G.E., Thornquist M.D., Balmes J., Cullen M.R., Glass A., Keogh J.P., Meyskens F.L., Valans B., Williams J. H., Barnhart S., Hammar S.*: Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *New England Journal Medicine* 1996, 334, 1150–1155.
 23. *Opatowsky A.R., Bilezikian J.P.*: Serum Vitamin A Concentration and the Risk of Hip Fracture among Women 50 to 74 Years Old in the United States: A Prospective Analysis of the NHANES I Follow – up Study. *American Journal of Medicine* 2004, 117, 169–174.
 24. *Sampietro G.M., Cristaldi M., Cervato G., Maconi G., Danelli P., Cervellione R., Rovati M., Bianchi Porro G., Cestaro B., Taschieri A.M.*: Oxidative stress, vitamin A and vitamin E behaviour in patients submitted to conservative surgery for complicated Crohn’s disease. *Digest Liver Dis.* 2002, 34, 696–701.
 25. *Scott K.J., Rodriquez–Amaya D.*: Pro-vitamin A carotenoid conversion factors: Retinol equivalents – fact or fiction. *Food Chemistry* 2000, 69, 125–127.
 26. *Venkatraman J.T., Angkeow P., Fernandes G.*: Effects of food restriction on antioxidant defense system in exercised rats. *Nutrition Research* 1998, 18, 2, 283–298.
 27. *Venditti P., Masullo P., Meo S.,D.*: Effect of Exercise Duration on Characteristics of Mitochondrial Population

- from Rat Liver. Archives of Biochemistry and Biophysics 1999, 368, 1, 112–120.
28. *Vliet T., Schaik F., Schoonhoven J., Schrijver J.*: Determination of several retinoids, carotenoids and E vitamin by High-Performance Liquid Chromatography. Application to plasma and tissues of rats fed a diet rich in either β – carotene or canthaxanthin. J. Chromat. 1991, 553, 179–186.
29. *Yamamoto T., Ohkuwa T., Itoh H., Sato Y., Naoi M.*: Relation between voluntary physical activity and oxidant/antioxidant status in rats. Comparative Biochemistry and Physiology 2003, Part C, 135, 163–168.
30. *Zaidi S.M.K.R., Al – Qirim T., Hoda N., Banu N.*: Modulation of restraint stress induced oxidative changes in rats by antioxidant vitamins. J. Nutr. Biochem. 2003, 14, 633–636.
31. *Zaidi S.M.K.R., Banu N.*: Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. Clinica Chimica Acta 2004, 340, 229–233.

Otrzymano: 08.09.2009

Zaakceptowano do druku: 07.12.2009

