

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA KRAMARIČ

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA KRAMARIČ

**VPLIV RETINOIDOV IN α -TOKOFEROLA NA JETRNI OKSIDATIVNI STRES IN
SINTEZO γ -GLUTAMILCYSTEIN LIGAZE**

**INFLUENCE OF RETINOIDS AND α -TOCOPHEROL ON LIVER OXIDATIVE
STRESS AND SYNTHESIS OF GLUTAMATE CYSTEINE LIGASE**

Ljubljana, 2014

Eksperimentalni del diplomske naloge sem opravljala na katedri za biokemijo Fakultete za farmacijo, Univerza Valencia, pod mentorstvom prof. Joaquin Timoneda Timoneda. Mentorstvo na Fakulteti za farmacijo, Univerza Ljubljana, je prevzel prof. dr. Janko Kos.

ZAHVALA

Na prvem mestu bi se rada zahvalila mentorju prof. dr. Janku Kosu za potrpežljivost in številne nasvete pri pisanju diplomskega dela. Zahvaljujem se delovnemu mentorju prof. Joaquin Timoneda Timoneda za prijaznost pri mojih prvih samostojnih korakih v laboratoriju. Hvala prof. dr. Alešu Mrharju in asist. dr. Stanetu Pajku za temeljit pregled diplome.

In nenazadnje, hvala moji razširjeni družini in prijateljem za vso podporo in dobro voljo. Posebene zahvale še mojemu čudovitemu fantu Martinu za neverjetno potrpežljivost, Saši za odprta ušesa in lekturo ter Katri za družbo pri prebijanju ledu s pisanjem.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janka Kos.

KAZALO VSEBINE

1 POVZETEK.....	v
2 ABSTRACT.....	vi
3 SEZNAM OKRAJŠAV.....	vii
4 UVOD.....	1
4.1 VITAMIN A.....	1
4.1.1 Terminologija.....	1
4.1.2 Viri vitamina A, njegova vloga in pomanjkanje.....	2
4.1.3 Vloga vitamina A v jetrih.....	3
4.1.4 Vitamin A kot (anti)oksidant.....	3
4.1.5 Retinojska kislina.....	5
4.2 VITAMIN E.....	6
4.3 OKSIDATIVNI STRES.....	7
4.4 GLUTATION IN GLUTAMAT CISTEIN LIGAZA.....	9
4.4.1 Glutation.....	9
4.4.1.1 Predstavitev.....	9
4.4.1.2 Sinteza in homeostaza.....	9
4.4.1.3 Delovanje GSH.....	10
4.4.1.4 GSH in AO neencimskega izvora.....	12
4.4.2 Glutamat cistein ligaza.....	13
4.4.2.1 Predstavitev GCL.....	13
4.4.2.2 Transkripcijska in posttranslacijska regulacija aktivnosti GCL.....	13
4.5 ŽIVALSKI MODELI.....	16
5 NAMEN DELA, NAČRTOVANJE EKSPERIMENTA IN HIPOTEZE.....	17
5.1 NAČRTOVANJE EKSPERIMENTA.....	17
5.2 HIPOTEZE.....	17
6 METODE IN MATERIAL.....	19
6.1 POSKUSNE ŽIVALI.....	19
6.2 ODVZEM IN SHRANJEVANJE VZORCEV.....	21
6.3 IZOLACIJA IN ANALIZA PROTEINOV Z METODO PRENOSA WESTERN.....	21
6.3.1 Priprava homogenatov in priprava vzorcev za elektroforezo.....	21
6.3.2 Elektroforezna ločba proteinov.....	22
6.3.3 Prenos proteinov na membrano.....	23
6.3.4 Detekcija proteinov, vezanih na membrano.....	23
6.3.5 Elektroforezni sistem, sistem za prenos western in računalniška oprema.....	24
6.4 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC).....	25
6.4.1 Priprava homogenatov in priprava vzorcev za HPLC.....	26
6.4.2 Opis kromatografskega sistema.....	27
7 REZULTATI.....	28
7.1 KVANTIFIKACIJE JETRNE GCLC.....	28
7.2 KVANTIFIKACIJA JETRNE GCLM.....	31
7.3 REZULTATI HPLC.....	34
8 DISKUSIJA.....	36
8.1 ANALIZA REZULTATOV HPLC.....	36
8.1.1 Povezava PVA z oksidativnim stresom.....	36
8.1.2 Vpliv vitamina E na oksidativni stres.....	37
8.1.3 Vpliv RK na oksidativni stres.....	38
8.1.4 Možni vzroki za nepričakovane rezultate.....	39
8.2 ANALIZA REZULTATOV PRENOSA WESTERN.....	40

8.2.1	Možni vzroki za nespremenjeno oziroma zmanjšano ekspresijo GCL.....	41
8.2.2	Pregled vpliva različnih pogojev na ekspresijo GCL.....	41
8.2.2.1	Vpliv HNE na ekspresijo GCL.....	42
8.2.2.2	Vpliv PVA, RK in vitamina E na ekspresijo GCL.....	45
9	SKLEP.....	48
10	LITERATURA.....	49
11	PRILOGE.....	54
11.1	Sestava pufrov, raztopin in gelov pri izolaciji in analizi proteinov.....	54
11.2	Sestava pufrov in raztopin pri HPLC.....	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Retinol.....	1
Slika 2: Vezava heterodimera RAR/RXR z ligandoma (9-cis ali all-trans-retinojsko kislino) na RARE element v promotorju gena.....	5
Slika 3: α -tokoferol.....	7
Slika 4: Zgradba GSH.....	9
Slika 5: Sinteza, regeneracija in izraba glutationa.....	10
Slika 6: Mehanizmi regulacije aktivnosti glutamat cistein ligaze.....	14
Slika 7: Shema hranjenja poskusnih živali.....	20
Slika 8: Prenos western.....	21
Slika 9: Prenos western: sestava večsloja za prenos proteinov z gela na membrano z uporabo tehnike mokrega prenosa.....	23
Slika 10: Shematski prikaz HPLC.....	26
Slika 11: PVDF membrana: izražanje katalitične podenote GCL	28
Slika 12: Izražanje katalitične podenote.....	29
Slika 13: Vpliv vitamina E na izražanje GCLC.....	30
Slika 14: Vpliv tretiranja z RK na izražanje GCLC.....	30
Slika 15: PVDF membrana: izražanje modulatorne podenote GCL	31
Slika 16: Izražanje modulatorne podenote.....	32
Slika 17: Vpliv vitamina E na izražanje GCLM.....	33
Slika 18: Vpliv tretiranja z RK na izražanje GCLM.....	33
Slika 19: Primer PVDF membrane po prenosu western in detekciji proteinov.....	34
Slika 20: Oksidativni stres v jetrih.....	35
Slika 21: Prikaz signalne poti, ki vodi v celično smrt zaradi prekomerne aktivacije JNK, ki jo povzroča kronični oksidativni stres.....	44

KAZALO TABEL

Tabela 1: Reaktivne kisikove vrste (ROS).....	8
Tabela 2: Mehanizem delovanja izbranih antioksidantov.....	8
Tabela 3: Kvantifikacija lis GCLC po prenosu western.....	28
Tabela 4: Kvantifikacija lis GCLM po prenosu western.....	31
Tabela 5: Povprečne vrednosti MDA, standardne deviacije in število meritev.....	34
Tabela 6: Pregled pogojev/tretiranja in njihovega vpliva na GCLC in GCLM.....	42

1 POVZETEK

Pomanjkanje vitamina A je pereč problem v državah v razvoju, saj vpliva na razvoj mnogih patoloških stanj, kot so motnje vida, rane na koži in sluznicah, hepatotoksičnost, fibroza ter kancerogeneza. Vitamin A deluje kot antioksidant, retinojska kislina, ki iz njega nastane v telesu, pa je jedrni dejavnik, ki vpliva na prepis genov. Antioksidativno delovanje izkazuje tudi vitamin E, katerega pomanjkanje pa je redko, saj ga najdemo v širokem naboru hrane.

Telo se proti oksidativnemu stresu bori tako z eksogenimi antioksidanti, kot z endogenimi spojinami. Ena izmed slednjih je glutathion. Ta je tripeptid, ki se nahaja v vseh celicah v telesu in med drugim skrbi za detoksifikacijo ksenobiotikov in nevtralizacijo radikalov. Encim, ki je omejujoč dejavnik za sintezo glutathiona, je glutamat cistein ligaza. Velja, da oksidativni stres, ki ga povzročajo različni agensi, kot je na primer pomanjkanje vitamina A, vodi v povečano aktivnost in ekspresijo encimov, povezanih z nevtralizacijo oksidativnega stresa, med njimi tudi glutamat cistein ligaze.

V našem eksperimentalnem delu smo na podganah preučevali vpliv stanj, kot so pomanjkanje vitamina A, visoka vsebnost vitamina E v prehrani in tretiranje z retinojsko kislino, na ekspresijo podenot glutamat cistein ligaze in na lipidno peroksidacijo v jetrih.

Stopnjo oksidativnega stresa smo ocenjevali preko razpadnega produkta lipidne peroksidacije, malondialdehida, s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Različne skupine se med seboj niso značilno razlikovale.

Ekspresijo obeh podenot glutamat cistein ligaze smo preučevali s tehniko prenosa western. V vseh eksperimentalnih skupinah so se vrednosti značilno razlikovale od kontrolne skupine, vendar je bila ekspresija v nasprotju s pričakovanji znižana. Potrebne so nadaljnje raziskave, s katerimi bi lahko potrdili ali ovrgli alternativne signalizacijske poti, ki bi lahko vodile v znižanje glutamat cistein ligaze ob povišanem oksidativnem stresu.

2 ABSTRACT

Vitamin A deficiency is a serious problem in poor countries since it causes many pathologies such as night blindness, development of skin and mucous wounds, hepatotoxicity, fibrosis and cancerogenesis. Vitamin A is a chain breaking antioxidant, whereas retinoic acid, a metabolite of retinol, performs its action by binding to its nuclear receptors and influences gene transcription. Vitamin E is another antioxidant, however, its deficiency is rare since it is present in many foods.

Organisms detoxify oxidative stress by exogenous antioxidants, such as vitamins, and by synthesis of endogenous substances able to react with free radical species. One of those is glutathione, tripeptide that can be found in every cell, being responsible for detoxification of xenobiotics and for neutralization of free radicals. Glutamate cysteine ligase (GCL) catalyzes the first and rate-limiting step in the production of the cellular glutathione. It is believed that oxidative stress caused by different agents, for example vitamin A deficiency, leads to increased activity and expression of enzymes, responsible for neutralization of oxidative stress.

We investigated the impact of vitamin A deficiency, high level of vitamin E in diet, and treatment with retinoic acid on the expression of both subunits of glutamate cysteine ligase and lipid peroxidation in rat liver.

We evaluated oxidative stress by measuring the product of lipid peroxidation, malondialdehyde, by HPLC. We didn't detect any significant differences between experimental groups.

Expression of both subunits of glutamate cysteine ligase was studied with the use of the western blot method. Surprisingly, all experimental groups had significantly lower expression of glutamate cysteine ligase than the control group. Further studies are needed to confirm the existence of alternative signalling pathways that could decrease the expression of glutamate cysteine ligase during increased oxidative stress.

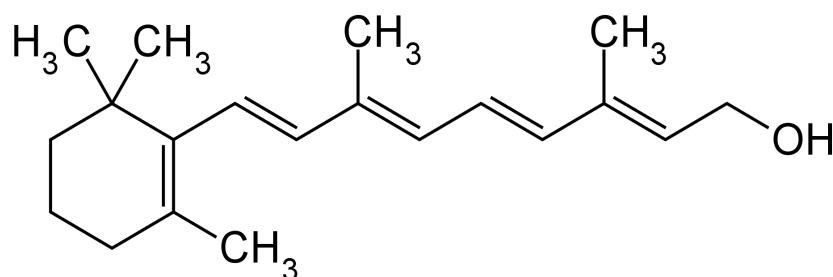
3 SEZNAM OKRAJŠAV

ALT	alanin aminotransferaza
AO	antioksidant
AP-1	aktivator protein 1 (transkripcijski faktor)
ATP	adenozin trifosfat
CAT	katalaza
c-Jun	protein, ki kot homo- ali hetero-dimera tvori AP-1 transkripcijski faktor
CRABP	celični vezavni protein za retinojsko kislino
CYP2E1	citokrom P450 2E1
CYP26	citokrom P450 26
Cys	cistein
DEM	dietilmaleat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ERK	kinaza, regulirana z ekstracelularnimi signali
GCL	glutamat cistein ligaza
GCLC	katalitična enota glutamat cistein ligaze
GCLM	modulatorna enota glutamat cistein ligaze
Glu	glutamat
Gly	glicin
GR	glutation reduktaza
GS	glutation sintetaza
GSH	glutation (reducirana oblika)
GSH-Px, GPx	glutation peroksidaze
GSSG	glutation (oksidirana oblika)
GST	glutation-S-transferaza
HNE	4-hidroksinonenal
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
JNK	c-Jun N-končna kinaza
Maf	transkripcijski dejavnik
MDA	malondialdehid
MDR	protein MDR (multi-drug resistance)
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfat (reducirana oblika)
NF-κB	proteinski kompleks, jedrni faktor
Nrf2	jedrni dejavnik, povezan z eritroidom 2
PVA	pomanjkanje vitamina A
RAR	receptor retinojske kisline
RARE	odzivno mesto za retinojsko kislino
RXR	retinoidni receptor X
RK	retinojska kislina
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
RNS	reaktivne dušikove zvrsti
RR	retinojski receptor
SOD	superoksid dismutaza
SRBI	vezavni protein B tip I
PVA	pomanjkanje vitamina A
TGF-β	transformirajoči rastni faktor β
γ-GC	γ-glutamalcistein

4 UVOD

4.1 VITAMIN A

Karotenoidi so heterogena skupina naravnih barvnih pigmentov z značilno dolgo alifatsko verigo konjugiranih dvojnih vezi, ki jim daje rumeno do rdečo barvo ter antioksidativne lastnosti. Beta karoten je lovilec singletnega kisika in je odgovoren predvsem za preprečevanje lipidne peroksidacije [1]. Vitamin A oziroma retinol je rumena lipofilna spojina [2], ki ima pomembno vlogo v embrionalnem razvoju, vidu, odpornosti proti infekcijam [3], rasti kosti, reprodukciji, celični delitvi in diferenciaciji [2]. Shranjuje se v tkivih v obliki retinilnih estrov [2].



Slika 1: Retinol [4]

4.1.1 Terminologija

Biosinteza karotenoidov poteka *de novo* iz izoprena, izključno v rastlinah in mikroorganizmih, sposobnih fotosinteze. Živali jih same ne morejo sintetizirati, lahko pa karotenoide, ki jih dobijo s hrano, modificirajo v množico substanc, ki jih potrebujejo za normalno fiziološko delovanje.

Karotenoide razdelimo v 2 skupini:

- karotene, ki so ogljikovodiki v strogem pomenu besede;
- ksantofile, ki so karoteni z eno ali več kisikovimi substitucijami (lutein, zeaksantin, kriptoksantin).

Aktivnost vitamina A je definirana kot sposobnost spojine, da podpira vid [5].

Nekateri karotenoidi so prekurzorji vitamina A; govorimo o provitamin A karotenoidih.

Najpogostejši v tej skupini so β -karoten, α -karoten in β -kriptoksantin. Iz njih z oksidativno cepitvijo osrednje verige na sredini *in vivo* nastaja retinol oziroma retinoidi.

Najpogostejša oblika vitamina A je vitamin A1, ki je kemijsko retinol. Ostali dve obliki, vitamin A2 in A3, imata pri višje razvitih živalih veliko nižjo aktivnost in ju zato lahko zanemarimo [5].

Retinoidi so derivati retinola, ki se razlikujejo le po končni kisikovi funkcionalni skupini. Retinolna hidroksilna skupina se lahko oksidira do aldehida (retinal) oziroma karboksilne kisline (retinojska kislina, RK) ali pa tvori estre. Retinol je izhodna molekula drugih aktivnih retinoidov (retinala in RK) [5].

4.1.2 Viri vitamina A, njegova vloga in pomanjkanje

Vitamin A se v glavnem nahaja v hrani v obliki dveh virov: predformiran vitamin A v obliki retinilnih estrov v hrani živalskega izvora (jajca, mlečni izdelki in jetra) ter v obliki karotenoidov, ki so provitamini A (β -karoten, α -karoten, likopen, lutein in β -kriptoksantin) v hrani rastlinskega izvora. Predformirana oblika vitamin A se kot retinol v človeškem telesu učinkovito absorbira (70-90 %) in uporabi, v nasprotju s karotenoidi, ki se absorbirajo le v 20-50 %. Dnevna potreba odrasle osebe po vitaminu A je 2333-3000 IU/dan [2][3].

Vitamin A regulira celično rast in ekspresijo genov, izboljšuje imunski odziv, ohranja vid in zmanjšuje oksidacijo v celicah. Tako preprečuje kardiovaskularne bolezni, bolezni oči in ščiti pred rakom [3].

Epidemiološke študije kažejo, da je pomanjkanje vitamina A (PVA) velik prehranski problem v svetu. V državah v razvoju PVA prizadane visok odstotek otrok in je med najpogostejšimi vzroki smrtnosti.

Fiziološka plazemska koncentracija vitamina A je 1-2 μ M in je pod skrbnim homeostatskim nadzorom. Plazemska koncentracija retinola pod 0,7 μ M kaže na PVA, pod 0,35 μ M pa na hudo PVA, ki jo spremlja povečano tveganje kliničnih manifestacij, kot so: motnje vida, rane na koži in sluznicah, embriotoksičnost, poškodbe kosti in zaostanek v rasti, hepatotoksičnost, fibroza ter kancerogeneza [6].

4.1.3 Vloga vitamina A v jetrih

Jetra so organ, kjer je shranjena velika večina vitamina A in so odgovorna za metabolizem ter regulacijo homeostaze retinoidov. Koncentracija vitamina A v jetrih zelo variira, kar je v glavnem posledica njegovega vnosa s hrano. Pri zdravih posameznikih je 90 % vitamina A shranjenega v maščobnih vakuolah stelatnih celic v jetrih, v glavnem v obliki retinolnih estrov.

PVA je povezano z aktivacijo jetrnih stelatnih celic. Aktivirane stelatne celice spominjajo na miofibroblaste. Njihova proliferacija je pospešena in sintetizirajo različne komponente zunajceličnega matriksa, kar med drugim vodi v fibrogenozo ter uničenje jetrnega tkiva.

Kronično PVA povzroči kopičenje maščobnih makrovakuol v hepatocitih (adipogenezo) in zviša raven plazemske alanin aminotransferaze (ALT). Dokazano je, da je RK nepogrešljiva za razvoj normalne zgradbe jeter, ter da njeno pomanjkanje vodi v jetrno steatozo, celično displazijo in raka. Prav tako PVA vodi v povečanje jetrnega katabolizma aminokislin in razgradnjo proteinov. Zadosten vnos vitamina A je torej pomemben za preprečevanje poškodb jeter in tudi za nadzor energijskega ravnotežja [6].

Antioksidativno delovanje vitamina A je posebej pomembno pri nizkem parcialnem tlaku kisika [6], kar ga uvršča med najučinkovitejše AO pri nizkih vsebnostih kisika, ki so značilne za fiziološke pogoje v tkivih [7]. Predpostavlja se, da je v primeru PVA, zmanjšana antioksidativna obramba glavni vzrok za nastanek poškodb tkiv. Tako je PVA v jetrih odgovorno za nastanek oksidativnega stresa, kar bi lahko igralo pomembno vlogo pri iniciaciji in /ali razvoju jetrnih lezij. Študije so pokazale tudi, da PVA pri podganah povzroča oksidativne poškodbe jetrnih mitohondrijev, ki pa so reverzibilne ob suplementaciji vitamina A. Reverzibilni sta tudi jetrna fibroza in celo ciroza, vendar so mehanizmi, odgovorni za to, še neraziskani [6].

4.1.4 Vitamin A kot (anti)oksidant

Vitamin A se lahko obnaša kot antioksidant ali kot oksidant, odvisno od parcialnega tlaka kisika in koncentracije retinoidov. Zaradi svoje lipofilnosti se nahaja v lipofilni membranski plasti celic, kjer z inhibicijo verižne oksidacije učinkovito sodeluje v zmanjševanju peroksidacije lipidov [8].

Njegove antioksidativne lastnosti lahko pojasnimo z različnimi mehanizmi:

- lipofilna veriga z dvojnimi vezmi lahko stabilizira peroksilne radikale ($\text{ROO}^\cdot$) in ujame singletni kisik ($^1\text{O}_2$) [7]. Pri nizkem parcialnem tlaku sta retinol in β -karoten konkurenca kisiku pri tekmovanju za lipidni radikal ($\text{L}^\cdot$) [9];
- radikali lahko neposredno oksidirajo retinol, pri čemer nastane 5,6-retinol epoksid [7].

Poročali so tudi, da lahko retinol nevtralizira potencialno škodljiv glutation radikal.

Antioksidativne lastnosti so značilne za vse derivate retinola, po moči pa si sledijo: retinol $\geq$ retinal $\gg$ retinilni palmitat $>$ retinojska kislina [7].

Poskusi, narejeni na živalih, ki so jim aplicirali retinol, so pokazali, da lahko retinoidi preprečijo peroksidacijo *in vivo*, kar so potrdile tudi študije na ljudeh, ki so jim aplicirali majhne doze vitamina A [8].

Antioksidativne lastnosti niso dokazane samo za vitamin A, pač pa tudi za več karotenoidov provitaminov A. Študije so pokazale, da so karotenoidi z 11 ali več dvojnimi konjugiranimi vezmi (β -karoten, kriptoksantin, lutein, likopen in zeaksantin) približno 5-krat boljši AO od retinola [7]. Prav zato, ker je v primerjavi z β -karotenom slabši lovilec kisika, retinol dolgo ni bil priznan kot AO, vendar so Ville in sod. v študiji ugotovili, da njegovih antioksidativnih lastnosti ne smemo zanemariti [9].

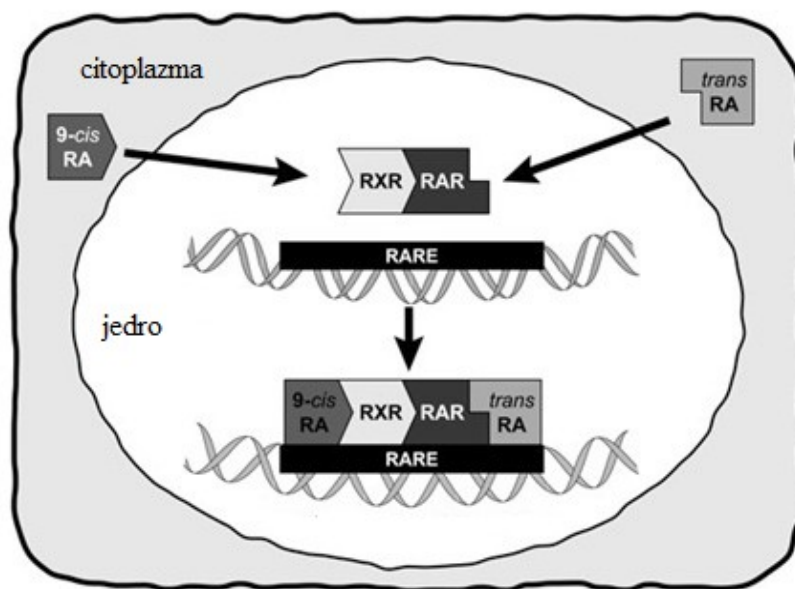
Kot že omenjeno, pa ima vitamin A v višjih odmerkih tudi sposobnost prooksidativnega obnašanja ter povzroča lipidno peroksidacijo in toksičnost [8]. Prav tako lahko zaradi svoje strukture retinol in karotenoidi avtooksidirajo pri višjem parcialnem tlaku kisika; višji kot je ta, verjetneje je, da bo karotenoid sodeloval v lipidni peroksidaciji [7].

V starejših študijah so opazili tudi oksidirane produkte RK, vendar pa so zaradi ekstremno nizke koncentracije RK v primerjavi z retinolom in njene relativno nizke antioksidativne aktivnosti, sklenili, da je malo verjetno, da bi bila RK tista, ki modulira celični oksidativni stres [7]. Nasprotno so nedavne študije pokazale, da fiziološke koncentracije RK znižajo lipidno peroksidacijo in zvišajo aktivnost encimov, ki so udeleženi pri nevtralizaciji radikalov. Nasprotno so visoki odmerki RK povišali stopnjo oksidativnega stresa. Ugotovili so celo, da RK generira hidroksilni radikal $^\cdot\text{OH}$ [10].

4.1.5 Retinojska kislina

Retinojska kislina se pred vstopom v jedro veže na celične vezavne proteine za retinojsko kislino (CRABP), po vstopu v jedro pa se kot ligand veže na dimerni retinoidni receptor (RR), ki se veže na specifična odzivna mesta za retinojsko kislino v promotorjih tarčnih genov. Nato RR dimer veže kofaktorje in začne se prepis tarčnih genov [5].

Obstajata 2 tipa retinoidnih nuklearnih receptorjev, ki sta vpletena v transkripcijski odziv na RK; RAR in RXR. RAR asociirajo z RXR in tvorijo RAR-RXR heterodimer, ki se veže na tarčno DNA zaporedje, imenovano RARE (odzivni element za retinojsko kislino). Člani RAR družine prepoznajo 2 naravna stereoizomera RK: vse-*trans* RK (all-*trans* RA, ATRA) in 9-*cis* RK, medtem ko člani družine RXR prepoznajo izključno slednjo [11].



Slika 2: Vezava heterodimera RAR/RXR z ligandoma (9-cis ali all-*trans*-retinojsko kislino) na RARE element v promotorju gena [14]

RAR: receptor retinojske kisline. RXR: retinoidni receptor. RARE: odzivni element za retinojsko kislino.

Podatki kažejo, da so RXR-RAR heterodimeri funkcionalna enota pri prevajanju retinoidnega signala za številne z RK povezane procese in da je RXR α glavni RXR receptor vpleten v funkcioniranje RAR. RXR-RAR heterodimeri se na RARE vežejo močnejše in bolj specifično od samih RAR [12]. RXR α je najpogostejši izotop RXR receptorja v jetrih in je pomemben pri regeneraciji jeter [13].

Zaradi močnih učinkov, ki jih poseduje RK, so znotrajcelične koncentracije RK pod nadzorom citokroma P450 (CYP26). Ta po potrebi deaktivira RK z oksidacijo na položaju 4 in 18. Ker so produkti bolj hidrofilni (4-okso-RA, 4-OH-RA in 18-OH-RA), se lažje izločijo iz celice [5].

4.2 VITAMIN E

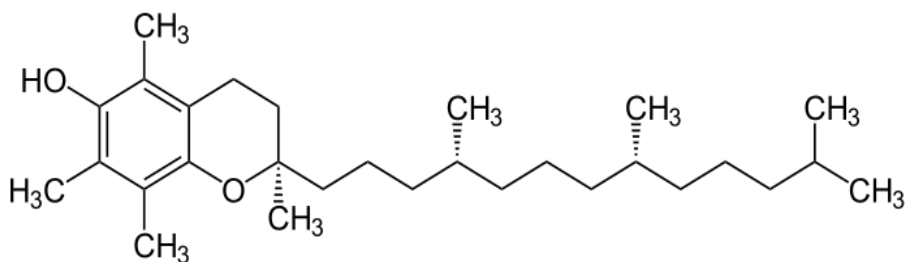
V naravi se vitamin E nahaja v osmih izomernih oblikah, od katerih je najbolj znan in za človeka pomemben α -tokoferol. Gre za lipofilni vitamin, ki se na celični ravni nahaja predvsem v membranah organelov (mitohondrijev in endoplazmatskega retikuluma) in plazmalemi [1].

Vitamin E najdemo v širokem naboru hrane, daleč največ pa ga je v rastlinskih oljih. V telesu se ga večina shranjuje v maščobnem tkivu ter nekaterih organih, kot so na primer jetra. Priporočen dnevni vnos je med 8 in 10 mg/dan. Njegovo pomanjkanje je redko in ponavadi povezano z malabsorbcijo maščob. Manifestira se kot anemija, hemoliza, retinopatija, mišična šibkost in nevrološke težave. Velike doze vitamina E ne povzročajo neželenih učinkov; poročali so o večletnem dnevnem vnosu med 400 in 800 mg/dan, ki je bil brez posledic. S povišanjem vnosa, se viša njegova koncentracija v maščobnem tkivu, koncentracija v jetrih pa ostaja konstantna [15].

Glavna naloga vitamina E je zaščita polinenasičenih maščobnih kislin, še posebej pomemben pa je v plazmi, kjer preprečuje nastanek poškodb na membranah eritrocitov [1]. Reagira z lipidnimi peroksilnimi radikali ($\text{LOO}^\cdot$) in se oksidira do tokoferilnega radikala in tako prepreči iniciacijo verižne peroksidacije [1][9]. Nastali radikal se nato inaktivira, tako da se združi še z enim tokoferilnim radikalom ali pa se reducira s pomočjo askorbinske kisline [1].

Tokoferol lovi radikale v hidrofilni fazi učinkoviteje od retinola zaradi hidroksiliranega kromanskega obroča na površini membrane. Obratno so antioksidativne lastnosti retinola bolj izražene v lipofilni membrani zaradi krajše polienske verige, ki mu omogoča večjo mobilnost in s tem poveča možnost interakcij s peroksilnimi radikali [7].

Tokoferol je najbolj učinkovit pri visokih parcialnih tlakih kisika, pri nižjih pa je njegov mehanizem manj izražen [9].



Slika 3: α -tokoferol [16]

Bansal *in sod.* so ugotovili, da so podgane, predhodno tretirane z vitaminom E, bolj odporne na nekatere oksidativne agense: v primerjavi s kontrolno skupino je bila stopnja lipidne peroksidacije nižja. Prav tako se po obremenitvi z oksidanti ni znižala koncentracije totalnega GSH in aktivnost GSH-reduktaze kot v kontrolni skupini [17].

4.3 OKSIDATIVNI STRES

Vsi aerobni organizmi so zaradi celičnega dihanja do neke mere podvrženi fiziološkemu oksidativnemu stresu. Pri celičnem dihanju namreč nastajajo produkti kot so superoksidni anion radikal ($O_2^{\cdot -}$), hidroksilni radikal ($HO^{\cdot}$) in vodikov peroksid (H_2O_2). Gre za reaktivne kisikove zvrsti (ROS; angl. reactive oxygen species), ki povzročijo peroksidacijo lipidov, proteinov in DNA ter tako poškodujejo celice.

Oksidativni stres je vrsta "kemičnega stresa", ki je prisoten v živih organizmih kot neposredna posledica škodljivega delovanja povečane količine ROS na celice in tkiva v organizmu. Gre za patološko stanje, ki se pojavi zaradi:

- zmanjšane antioksidativne zaščite (zaradi zmanjšane vnosa, biorazpoložljivosti ali sinteze AO),
- neustreznega delovanja AO sistemov,
- in/ali prevelike tvorbe radikalov (posledica vnetij, infekcij, ksenobiotikov, intraceličnega stresa ter povečanega uživanja zdravil ali AO) [1].

radikalske vrste		neradikalske vrste	
superoksidni anion	$O_2^{\cdot -}$	tripletni kisik	3O_2
hidroksilni radikal	$OH^{\cdot}$	singletni kisik	1O_2
hidroperoksilni rad.	$O_2H^{\cdot}$	ozon	O_3
alkoksilni radikal	$RO^{\cdot}$	vodikov peroksid	H_2O_2
peroksilni radikal	$ROO^{\cdot}$	hidroperoksid	$ROOH$
aroksilni radikal	$ArO^{\cdot}$	peroksidi	$ROOR$
semikinonski radikal	$UQ^{\cdot}$	hipoklorna kislina	$HClO$

Tabela 1: Reaktivne kisikove vrste (ROS) [1]

AO imajo različne mehanizme delovanja: sekvestriranje kovin, katalitično odstranjevanje ROS in lovljenje radikalov. Med lovilce radikalov spadajo vitamin A, vitamin E in GSH. To so nizkomolekularne snovi, ki delujejo tako, da reagirajo z radikali, jih nevtralizirajo, sami pa pri tem pridobijo lastnosti radikalov [1].

antioksidant	mehanizem delovanja
vitamin E (tokoferol)	nevtralizira radikale
vitamin C (askorbinska kislina)	reagira neposredno z $O_2^{\cdot -}$ in $OH^{\cdot}$, nevtralizira ROS
β -karoten	lovilec 1O_2 , reagira tudi s peroksilnimi radikali
glutation (GSH)	lovilec $OH^{\cdot}$ in 1O_2 , reducira organske perokside

Tabela 2: Mehanizem delovanja izbranih antioksidantov [1]

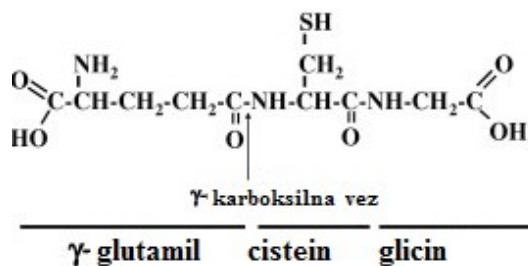
Natančno število bolezni, povezanih z oksidativnim stresom, je težko določljivo, mednje pa prav gotovo sodijo današnje civilizacijske bolezni, kot so srčno-žilne bolezni, presnovne bolezni, rak, nevrodegenerativne bolezni in ne nazadnje tudi pospešeno staranje [1].

4.4 GLUTATION IN GLUTAMAT CISTEIN LIGAZA

4.4.1 Glutation

4.4.1.1 Predstavitev

Glutation je tripeptid (γ -L-glutamat-L-cistein-glicin), ki se nahaja v milimolarnih koncentracijah v vseh tkivih sesalcev, še posebej veliko pa ga najdemo v jetrih (5-10 mM) [13][18]. Obstaja v reducirani (tiolni- GSH) in oksidirani (disulfidni- GSSG) obliki. Prevladujoča je GSH oblika, medtem ko GSSG oblika predstavlja manj kot 1 % glutatona. V citosolu najdemo 80 - 85 % glutatona, 10 - 15 % v mitohondriju, majhen del pa v endoplazmatskem retikulumu [13][19]. Ker sinteza GSH poteka v citosolu, je za vzdrževanje koncentracije v mitohondriju potreben transport. Pri fiziološkem pH se GSH nahaja v obliki aniona [18].



Slika 4: Zgradba GSH: N-terminalni konec glutamat in cistein sta povezana z γ -karboksilno skupino glutamata [13].

4.4.1.2 Sinteza in homeostaza

Sinteza glutatona poteka v citosolu vseh celic sesalcev in je strogo nadzorovana. Glavna dejavnika, ki določata stopnjo sinteze, sta razpoložljivost cisteina (aminokisline z žveplom, ki je predkurzor glutatona) in aktivnost enega izmed encimov, odgovornega za sintezo: glutamat cistein ligaze (GCL), znane tudi kot γ -glutamylcistein sintetaze [19].

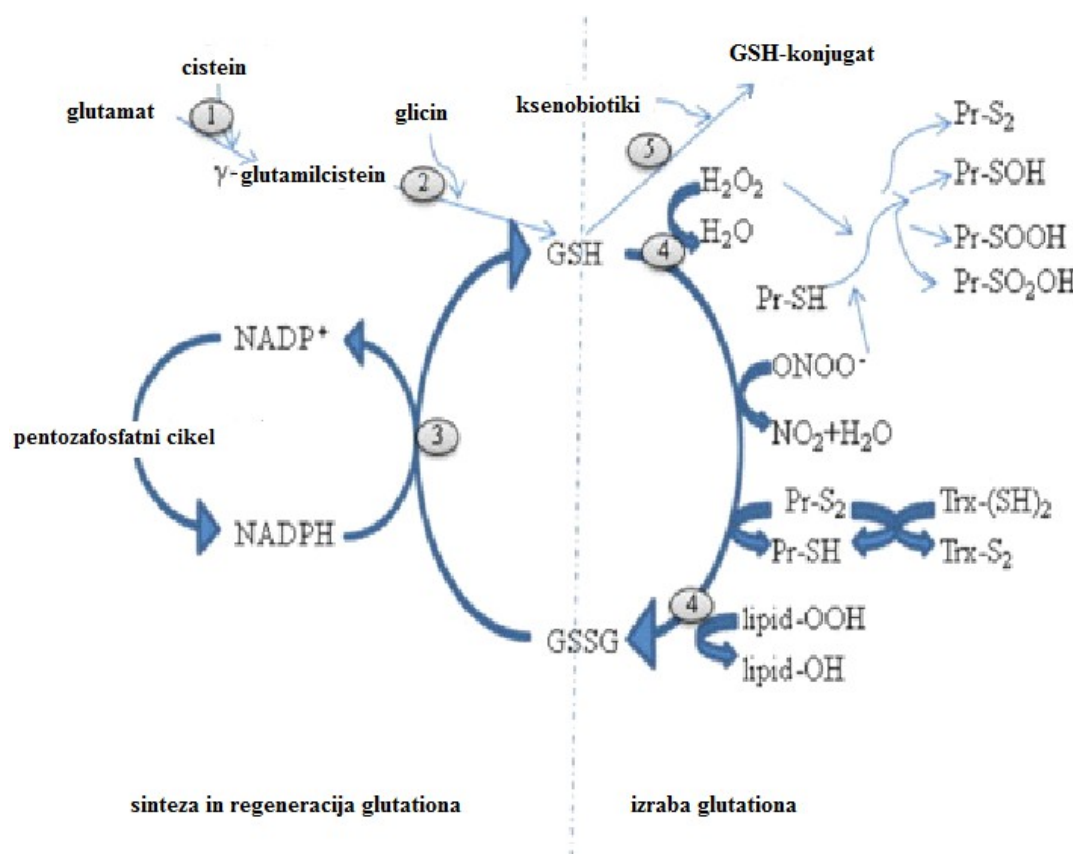
Sinteza GSH poteka v dveh korakih; v prvem koraku GCL [1] katalizira kondenzacijo cisteina in glutamata v γ -glutamylcistein (γ -GC), pri čemer se porabi ena molekula ATP [18][19]. V drugem koraku glutation sintetaza (GS) [2] katalizira vezavo glicina na γ -GC (Slika 5). Pri tem se prav tako

porabi ena molekula ATP.

Homeostaza GSH v celicah je regulirana na več ravneh: s sintezo, porabo in izločanjem iz celice. Kljub temu, da ima večina celic sposobnost sintetizirati GSH *de novo*, večina organov prejema GSH, ki se po krvnem obtoku prenaša iz jeter [19]. Plazemske koncentracije GSH in cisteina so torej v veliki meri odvisne od sinusoidalnega toka jetrnega GSH. Jetra tako igrajo osrednjo vlogo pri ohranjanju GSH homeostaze v vseh organih [13][19], odgovorna pa so tudi za sintezo GSH, ki se izloči v žolč [20].

Ker plazemski GSH kot vir cisteina uporabljajo mnoge celice, ostaja njegova koncentracija v plazmi zelo nizka [18].

4.4.1.3 Delovanje GSH



Slika 5: Sinteza, regeneracija in izraba glutationa. [1] GCL; glutamat cistein ligaza. [2] GS; glutation sintetaza. [3] GR; glutation reduktaza. [4] GPx; glutation peroksidaza. [5] GST; glutation-S-transferaza. [19]

GSH skrbi za številne vitalne funkcije, med drugim za:

I. detoksifikacijo elektrofilov (ksenobiotikov in/ali njihovih metabolitov);

Gre za elektrofile, ki tvorijo konjugate z GSH bodisi spontano bodisi z encimsko reakcijo, ki jo katalizira GSH-S-transferaza [5] (*Slika 5*). Konjugati se nato izločijo iz celice (v primeru hepatocitov v žolč) [13] s pomočjo membranskih transporterjev, kot je MDR protein [18].

II. nevtralizacijo radikalov (ščiti pred oksidativnim stresom);

Za nevtralizacijo ROS skrbi več encimov, med drugim superoksid dismutaza (SOD), katalaza in glutation peroksidaza (GSH-Px). SOD reducira $O_2^{\cdot -}$ do H_2O_2 , ki ga nato do vode reducirata katalaza ali GSH-Px [13][19].

Med drugimi pomembnimi nalogami GSH-Px je tudi pretvarjanje lipidnih hidroperoksidov, ki nastajajo med lipidno peroksidacijo, v manj toksične alkoholne derivate.

Samostojno ali ob sodelovanju GSH-Px lahko GSH tudi nevtralizira reaktivne dušikove zvrsti (RNS) kot je na primer peroksinitrit ($ONOO^-$) [19].

III. ohranjanje tiolne funkcionalne skupine proteinov (ohranjanje funkcije proteinov, občutljivih na redoks potencial) ter ohranjanje redoks potenciala v celici;

GSH redoksni sistem sestavljata encima glutation peroksidaza (GSH-Px) [4] in glutation reduktaza (GR) [3] ter njun substrat, glutation (GSH) (*Slika 5*). GSH-Px katalizira redukcijo vodikovega peroksida ali organskih peroksidov do vode, pri čemer pride do oksidacije GSH, ki se pretvori v dimerno obliko (GSSG). Sledi regeneracija reducirane oblike GSSG, ki jo katalizira GR. Pri tej reakciji kot vir energije služi oksidacija NADPH [13].

GSH je glavni dejavnik, ki določa redoks potencial znotraj celice, saj je njegova koncentracija 100-krat do 10.000-krat večja kot so koncentracije drugih redoks parov (na primer $NADP^+/NADPH$, tioredoksin) [19].

Razmerje GSH/GSSG je 100:1 in se ohranja s konstantno redukcijo GSSG;



Redoks potencial v celici je odvisen od količine GSH in razmerja GSH/GSSG. Manjši oksidativni

stres lahko zmanjša koncentracijo GSH, ne da bi spremenil razmerje GSH/GSSG. Večje koncentracije GSH (kot so na primer prisotne v hepatocitih) pomenijo večjo kapaciteto celice za redukcijo [19]. V primeru hudega oksidativnega stresa je lahko presežena celična kapaciteta redukcije GSSG v GSH, kar vodi v akumulacijo GSSG [13]. Ker je GSSG za celico potencialno toksičen, se celica izogne porušenju redoks ravnovesja tako, da ga izloči z aktivnim transportom ali pa GSSG zreagira s proteinom s sulfhidrilno skupino (Pr-SH) v mešan disulfid (Pr-SSG) [13][18]. Redoksnost razmerje med GSH in GSSG je tako dober kazalec oksidativnega stresa.

Razmerje GSH/GSSG preko na-redoks-občutljivih transkripcijskih faktorjev prispeva k regulaciji številnih metabolnih procesov, vključno z encimsko aktivnostjo, transportom, proliferacijo, signalizacijo, ekspresijo genov ter celično smrtjo [13][19].

IV. rezervoar cisteina;

Ena izmed najpomembnejših funkcij GSH je shranjevanje cisteina, saj je ta zunaj celice izredno nestabilen in hitro avtooksidira v cistin, pri čemer se sproščajo potencialno toksični radikali. GSH se pri prehodu v celico razgradi, znotraj celice pa se njegove komponente v odvisnosti od njenih potreb ponovno vgradijo v GSH (večina), porabijo za sintezo proteinov, ali pa razgradijo do sulfata in tavrina [13].

V. modulacijo številnih pomembnih procesov v celici, kot so sinteza DNA, procesi povezani z mikrotubuli in imunske funkcije. GSH tudi regulira dušik-kislikovo homeostazo, aktivnost proteinov s posttranslacijskimi modifikacijami in aktivnost nevrotansmitorskih receptorjev [13].

4.4.1.4 GSH in AO neencimskega izvora

GSH je najpomembnejši AO z majhno molekulsko maso, ki ga proizvajajo celice, obstajajo pa tudi druge nizko molekularne spojine z antioksidativnim delovanjem, ki jih organizem dobi iz hrane; med njimi sta vitamin E in C. Vitamin E lahko nevtralizira lipidne hidroksilne radikale in lipidne perokside, ki nastajajo med oksidacijo polinenasičenih maščobnih kislin. Vitamin C nato oksidira reduciran vitamin E v neencimski, a hitri reakciji. Sledi regeneracija oksidirane vitamina C v njegovo reducirano obliko s pomočjo encimsko kataliziranih reakcij; v eni izmed njih GSH služi kot substrat [18].

4.4.2 Glutamat cistein ligaza

4.4.2.1 Predstavitev GCL

Prvo stopnjo biosinteze GSH katalizira GCL, ki je sestavljena iz težke oziroma katalitične verige (GCLC, 73.0 kDa) in lahke oziroma modulatorne enote (GCLM, 27.7 kDa). Verigi kodirata različna gena, ki se nahajata na različnih kromosomih, za oba pa so pri človeku znani polimorfizmi [20][21]. Katalitična enota je odgovorna za katalitično aktivnost GCL, prav tako pa GSH preko nje povratno inhibira aktivnosti GCL. Modulatorna enota je encimsko neaktivna, vendar igra pomembno vlogo pri regulaciji aktivnosti GCL, saj zviša afiniteto encima za glutamat in zniža afiniteto za GSH, kar naredi GCL bolj učinkovito pri katalizi in manj dovzetno za inhibicijo s strani GSH [13][19]. GSH povzroča povratno inhibicijo sinteze preko dveh mehanizmov: z redukcijo encima in s kompeticijo z glutamatom za glutamat-vezoče mesto encima GCL [19][22]. Čeprav GCLM ni ključna za preživetje, je pomembna, saj 4- do 5-krat zviša aktivnost GCLC. Miši z izbitim genom za GCLM so kazale povišano občutljivost na oksidativni stres, njihova raven GSH v tkivu pa je bila znižana za 85 - 90 % [13][23].

Aktivnost podenot GCL je regulirana na večih stopnjah in včasih v različni meri [13].

4.4.2.2 Transkripcijska in posttranslacijska regulacija aktivnosti GCL

Regulacija aktivnosti GCL v celici poteka preko sledečih mehanizmov, ki so predstavljeni na *Sliki 6*.

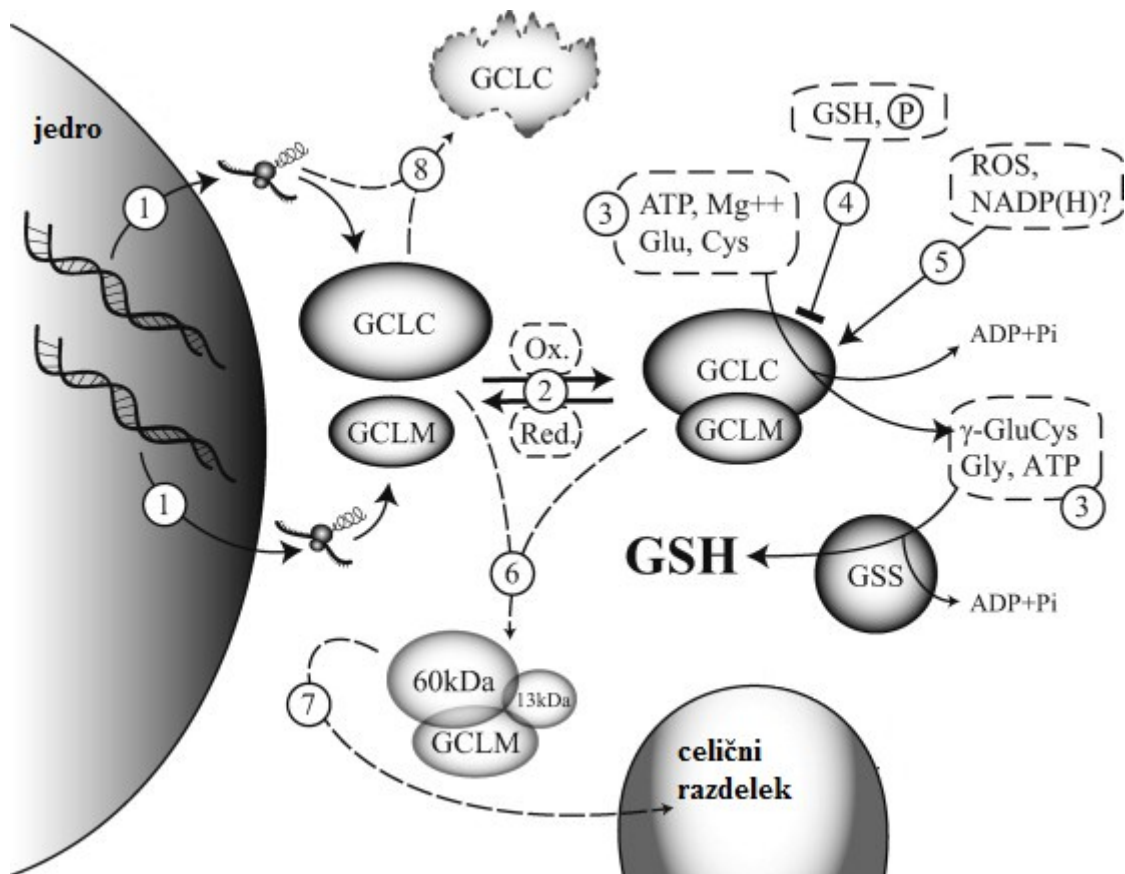
[1] Transkripcijsko ali posttranskripcijsko: aktivacija ali zavrtje transkripcije genov in /ali sprememba mRNA stabilnosti. Na promotorje obeh genov se lahko vežejo številni regulatorni transkripcijski dejavniki, kot so transkripcijski dejavniki Nrf2 družine, AP1, AP3, NFκB, proteini Maf družine, JunD, Fra, CREB in drugi.

[2] Preko reverzibilne tvorbe GCL holoencima; ta je odvisna od redkos stanja v celici, molarne koncentracije GCL podenot (ponavadi je omejujoča GCLM) in stabilnosti podenot.

[3] Preko razpoložljivosti substratov (Glu, Cys, Gly) in kofaktorjev (ATP, Mg²⁺).

[4] Preko inhibicije aktivnosti GCLC podenote; negativna povratna regulacija GSH, avtofosforilacija, fosforilacija, povzročena s strani kinaz.

[8] Preko inducibilnih ali mutacijskih sprememb stabilnosti GCLC proteina. Stabilnost encima se lahko bodisi poviša bodisi zmanjša [20].



Slika 6: Mehanizmi regulacije aktivnosti glutamat cistein ligaze [20]

Relativni koncentraciji obeh podenot GCL sta glavni dejavnik, ki določa aktivnost GCL v celici.

Oksidativni stres inducira sintezo obeh podenot GCL, vendar so mehanizmi, ki pripeljejo do tega, za podenoti različni, poleg tega pa je različna tudi stopnja indukcije.

Kljub očitni pomembnosti nivoja GCLC za aktivnost GCL, so nedavne študije pokazale, da je povečana ekspresija GCLM verjetno učinkovit mehanizem za povečanje aktivnosti GCL v celici, saj je v večini celic in tkiv GCLM omejujoč dejavnik za tvorbo GCL holoencima.

Vse kaže, da lahko oksidativni stres preko neposredne posttranskripcijske modifikacije ene ali obeh podenot GCL in s transkripcijsko regulacijo ekspresije GCL podenot poveča aktivnost encima.

Kratek čas, ki je potreben za aktivacijo GCL (od 10 minut do 1 ure) in nezmožnost sinteze proteinov *de novo* v tem času, izključujeta vpletenost povečane ekspresije GCL podenot kot edini odgovor na oksidativni stres.

Hitra regulacija aktivnosti GCL je dosežena tudi s posttranslacijskimi modifikacijami že obstoječih GCLC in/ali GCLM podenot. V tem pogledu je oksidativni stres sposoben stimulirati aktivnost GCL, pred ali brez povečane ekspresije podenot GCL. Subtoksične koncentracije vodikovega peroksida in nekaterih drugih oksidirajočih substanc prehodno stimulirajo aktivnost GCL, ne da bi znotraj mej detekcije povečale stopnjo GCL podenot [20].

Oksidativni stres in regulacija GCLC

Ravnotežno stanje mRNA GCLC uravnavajo številni dejavniki, med njimi različni AO ter produkti lipidne peroksidacije. HNE, 4-hidroksinonenal, je eden izmed glavnih produktov lipidne peroksidacije, ki je v človeški plazmi prisoten tudi pri normalnih pogojih, med oksidativnim stresom pa njegove koncentracije močno narastejo. Pred kratkim je bilo dokazano, da HNE v normalnih plazemskih koncentracijah inducira GCLC, kar nakazuje, da je osnovna raven ekspresije GCLC regulirana s produkti lipidne peroksidacije [13].

Produkti lipidne peroksidacije (HNE, DEM) poleg povečane transkripcije gena GCLC tudi stabilizirajo njegov mRNA in tako delujejo na posttranskripcijski ravni [13].

Oksidativni stres in regulacija GCLM

Produkti lipidne peroksidacije (HNE, 15d-PGJ2) inducirajo tudi GCLM, čeprav se zdi, da so signalne poti pri fizioloških in patoloških koncentracijah različne. Vsi induktorji oksidativnega stresa pa ne inducirajo GCLM. Znano je na primer, da etanol in TGF- β 1, ki sta induktorja oksidativnega stresa, ne povečata GCLM ekspresije.

Na nivoju posttranskripcijske regulacije HNE poveča stabilnost mRNA GCLM preko *de novo* sinteze proteinov [13].

Ker deregulacijo sinteze GSH v vedno večji meri prepoznavajo kot dejavnik, ki prispeva k razvoju različnih patologij, vključno z diabetesom, pljučno fibrozo itd., postaja nadzor nad kapaciteto sinteze GSH pomembna tarča pri kontroli teh bolezni [13].

4.5 ŽIVALSKI MODELI

Živalski modeli so se pokazali kot nepogrešljivi pri preučevanju bolezni, testiranju zdravil in razumevanju fizioloških procesov. Živa bitja so kompleksni sistemi, pri katerih je brez opazovanja in testiranja celotnega organizma nemogoče raziskovati, razložiti ali napovedati učinke, ki jih imajo nanj različni stimuli.

Živalski model je izbran tako, da kar najbolj posnema človeško telo tako v taksonomičnem kot v fiziološkem smislu. S podganami delimo kar 98 % genov, kar pomeni, da so dovzetne za podobne zdravstvene probleme [24].

Delo na Wistar podganah nam je omogočilo nadzor nad kar največjim številom spremenljivk, ki bi lahko vplivale na rezultate, med drugim tudi okoljem in prehrano. Rezultati tako nadzorovanega eksperimenta naj bi kar najbolj natančno pokazali vpliv PVA, vitamina E in RK na stopnjo oksidativnega stresa, ki ga povzroča takšna prehrana in vpliv, ki ga ima ta na encime, odgovorne za sintezo GSH. Eksperiment nam omogoča boljše razumevanje kompleksnih procesov, povezanih z oksidativnim stresom, ki je glavni povzročitelj številnih sodobnih bolezni. Tako pridobljeni podatki pa imajo tudi aplikativno uporabo, saj bi jih lahko ekstrapolirali na človeka in poiskali možne ukrepe, s katerimi bi se lotili reševanja PVA v državah v razvoju.

5 NAMEN DELA, NAČRTOVANJE EKSPERIMENTA IN HIPOTEZE

Namen dela je bilo ugotoviti, kako pomanjkanje retinola vpliva na koncentracijo obeh GCL podenot, če lahko hrana, bogata z α -tokoferolom, kompenzira pomanjkanje retinola, ter če so opažene spremembe reverzibilne po tretiranju z RK.

5.1 NAČRTOVANJE EKSPERIMENTA

Eksperimentalni del študije smo izvedli na 27 vzorcih jeter samcev podgan vrste Wistar. Gre za potomce samic, ki so bile predhodno glede na dieto razdeljene v 3 eksperimentalne skupine; kontrolno, dieto brez retinola in dieto, kjer je retinol nadomeščen z vsebnostjo tokoferola, ki je desetkratnik normalne doze (100 mg/dan). Dieto smo doječim samicam uvedli po kotitvi (21 dni), ter z njo nadaljevali na odraščajočih samcih (60 dni). Po tem času smo skupini z dieto brez retinola ter dieto, v kateri je bil retinol nadomeščen z visoko vsebnostjo tokoferola, razdelili na pol. Polovico smo žrtvovali skupaj s kontrolno skupino, polovica pa je še 10 dni prejemale intraperitonealne injekcije RK (100 μ g) v sončničnem olju (100 μ l), nakar je bila prav tako žrtvovana.

Iz jetrnih vzorcev smo izolirali proteine in jih kvalitativno in semi kvantitativno ovrednotili z uporabo metode prenosa western. S primerjavo količine izraženega encima (obeh podenot) smo preučevali učinek prej opisanih tretiranj na proteinskem nivoju in sklepali na uravnavanje sinteze proteinov, ki poteka na transkripcijskem ali posttranskripcijskem nivoju.

S HPLC analizo smo izmerili koncentracije enega izmed razpadnih produktov lipidne peroksidacije (malondialdehida, MDA) v vzorcih jeter, kar nam je omogočilo oceno stopnje oksidativnega stresa, ki je znan dejavnik (post)transkripcijske regulacije GCL.

5.2 HIPOTEZE

- Retinol v fizioloških koncentracijah kaže antioksidativne lastnosti, zato sklepamo, da se bo stopnja oksidativnega stresa v jetrih živali, ki bodo prejemale dieto brez retinola, povečala. Nadomestitev retinola z visoko vsebnostjo tokoferola v hrani in naknadno tretiranje z RK bo zaradi njunega antioksidativnega delovanja značilno znižalo raven oksidativnega stresa.

- Zvišana stopnja oksidativnega stresa bo inducirala sintezo encimov, odgovornih za sintezo GSH, med njimi glutatamat cistein ligaze, zato predvidevamo, da bodo koncentracije GCLM in GCLC v poskusnih skupinah v primerjavi s kontrolno, povečane. V skupinah z manjšim oksidativnim stresom, bo manjše tudi povečanje ekspresije obeh podenot GCL.

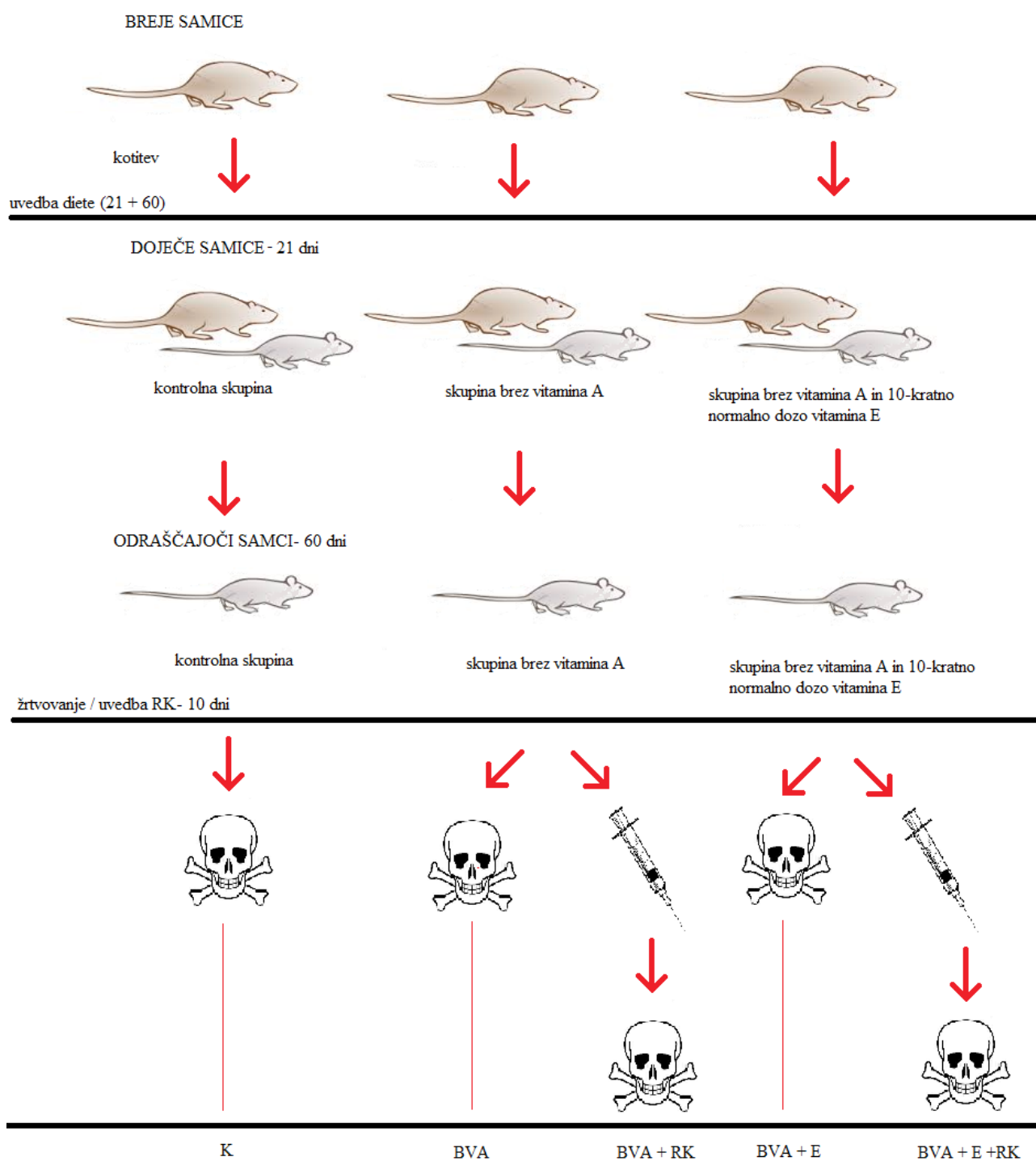
6 METODE IN MATERIAL

6.1 POSKUSNE ŽIVALI

Živali so imele nastanitev in bile tretirane v skladu s kriteriji, objavljenimi v »Guide for the Care and Use of Laboratory Animals« [25].

Breje podganje samice vrste Wistar, ki so bile vzrejene v laboratoriju Charels River, Barcelona, so razdelili v tri skupine in jih namestili v ločene kletke v izoliranem prostoru s stalno zračno vlago, temperaturo med 22 °C in 25 °C, z 12 urami dnevne ter 12 urami nočne svetlobe in z neomejenim dostopom do vode.

Dan po kotitvi so samice iz kontrolne skupine (K) začeli krmiti z dieto ICN [AIN-93G] (ICN-Biomedical, Cleveland, Ohio, ZDA) po priporočilih American Institute of Nutrition [26]. Samice skupine BVA so hranili z enako dieto, le da ni vsebovala retinola, v dieti samic skupine BVA + E pa je bil retinol zamenjan z desetkratnikom normalne koncentracije tokoferola (100 mg/dan). S hranjenem doječih mater s pripadajočimi dietami so zagotovili pomanjkanje retinola v mleku ter tako skrajšali obdobje uvajanja [27]. Po 21 dneh dojenja so samcem dodeli enake diete, kot so jih prejemale njihove matere; kontrolne živali (K) (s plazemsko koncentracija retinola približno 1,2 µM), živali z dieto brez vitamina A (BVA) (s plazemsko koncentracija retinola približno 0,05 µM) in živali z dieto brez vitamina A a z nadomestilom vitamina E (BVA + E) (s plazemsko koncentracijo retinola približno 0,06 µM). Zadnji dve skupini so po 60 dneh eksperimenta razdelili na 2 dela; polovica obeh skupin je bila žrtvovana z uporabo postopka dekapitacije hkrati s kontrolno skupino (5 živali skupine K, 7 skupine BVA, 5 skupine BVA + E), druga polovica pa je 10 dni nadaljevala z obstoječo dieto ter dnevno prejemale intraperitonealne injekcije RK (100 µg) v sončničnem olju (100 µl) (6 živali skupine BVA + RK, 4 skupine BVA + E + RK) ter bila žrtvovana po tem [27].



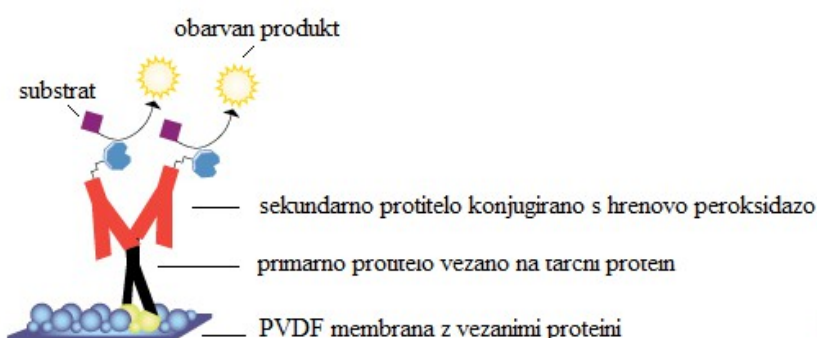
Slika 7: Shema hranjenja poskusnih živali

6.2 ODVZEM IN SHRANJEVANJE VZORCEV

Po evtanaziji so odvzeta jetra nemudoma zmrznili v tekočem dušiku in jih hranili pri temperaturi – 80 °C.

6.3 IZOLACIJA IN ANALIZA PROTEINOV Z METODO PRENOSA WESTERN

Prenos western je ena najpogostejših kvalitativnih in semikvantitativnih metod analize proteinov. Temelji na detekciji tvorbe specifičnih kompleksov med dodanimi protitelesi in proteini, imobiliziranimi na membrano. Najprej izolirane proteine ločimo z gelsko elektroforezo in jih nato z gela prenesemo na membrano. Prosta mesta na membrani blokiramo z vezavo proteinov iz mleka, s čimer preprečimo nespecifično vezavo dodanih primarnih protiteles. Po vezavi protiteles na ciljni protein iz vzorca, preostanek primarnih protiteles speremo in dodamo sekundarna protitelesa, ki se vežejo na primarna protitelesa, vezana na tarčni protein. Uporabljena sekundarna protitelesa so konjugirana z encimom hrenovo peroksidazo, ki katalizira reakcijo med dodanim substratom vodikovim peroksidom in diamino-benzidinom [28].



Slika 8: Prenos western: tarčni protein je imobiliziran na membrani, nanj se veže primarno protiteleso, na katerega se pritrdi sekundarno protiteleso. To je konjugirano z encimom, ki spremeni dodani substrat v obarvan produkt [29].

6.3.1 Priprava homogenatov in priprava vzorcev za elektroforezo

Reagenti za homogenizacijo:

- lizatni pufer I (opisan v Dodatku),

- Protease Inhibitor Cocktail Sigma P-8340 (Sigma-Aldrich).

Vzeli smo 0,1 g vzorcev zmrznjenih jeter, ki smo predhodno hranili pri -80 °C in jih 10-15 s homogenizirali z 1 ml lizatnega pufra I in 5 µl zmesi proteaznih inhibitorjev (Sigma P-8340) z uporabo rotor-stator homogenizatorja. Nato smo vzorce 20 min centrifugirali pri 13 000 rpm. Vsi procesi so potekali pri sobni temperaturi, tako pripravljene vzorce pa smo nato do uporabe hranili pri -20 °C.

Reagenti za pripravo vzorcev za elektroforezo:

- nanašalni pufer,
- bidestilirana voda.

Homogenate, ki smo jih hranili v zmrzovalniku pri temperaturi -20 °C, smo odtajali pri sobni temperaturi in nato odpepitirali 10 µl (za GCLC, oziroma 5 µl za GCLM) k ostalima reagentoma. Tako pripravljene vzorce smo nato 10 minut greti na vodni kopeli s temperaturo 100 °C, s čimer smo jih denaturirali, in jih postavili na led, dokler se niso ohladili. Sledilo je 10 sekundno centrifugiranje pri 1200 rpm (z namizno centrifugo).

6.3.2 Elektroforezna ločba proteinov

Reagenti:

- koncentracijski in ločilni poliakrilamidni gel,
- označevalec velikosti proteinov (Fermentas, Thermo Scientific),
- elektroforezni pufer (ang. Running buffer).

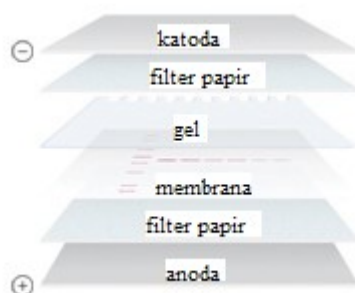
Ločba proteinov v vzorcu je potekala s pomočjo elektroforeze na 18 % SDS-poliakrilamidnem gelu (SDS-PAGE). Uporabljali smo vertikalni gel debeline 1,5 mm, ki je sestavljen iz zgornjega koncentracijskega in spodnjega ločilnega dela. Koncentracijski gel je namenjen zgostitvi vzorcev v tanko linijo, kar omogoča hkraten prehod vseh vzorcev na ločilni gel, kjer poteka ločba na osnovi velikosti proteinov. 10 µl predhodno pripravljenih vzorcev smo nato vnesli v razdelke koncentracijskega gela. Ob strani smo nanесли 5 µl nanašalnega pufra z označevalcem velikosti proteinov (razmerje 1:1). Elektroforeza je potekala v elektroforeznem pufru Tris-glicin pri konstantni napetosti 150 V, dokler ni barvilo iz nanašalnega pufra doseglo dna gela.

6.3.3 Prenos proteinov na membrano

Reagenti:

- pufer za prenos proteinov (ang. Transfer buffer),
- Whatmann 3MM filter papir,
- PVDF membrana IMMOBILON P (MILLIPORE) model Immun-Blot™, velikost por 0,2 μm (Bio-Rad, ZDA),
- sistem za prenos (Bio-Rad, ZDA).

Po ločitvi proteinov z elektroforezo je sledil elektroforezni prenos proteinov z gela na membrano (trdne nosilce) s tehniko mokrega sistema z uporabo BioRad sistema.



Slika 9: Prenos western: sestava večsloja za prenos proteinov z gela na membrano z uporabo tehnike mokrega prenosa. [28]

Prenos je potekal v pufru za prenos proteinov pri konstantnem toku 130 mA. Izvajali smo ga pri temperaturi 4 °C čez noč (18 ur).

6.3.4 Detekcija proteinov, vezanih na membrano

Reagenti:

- mleko- Blotting Grade Blocker (Biorad Laboratories, ZDA),
- TBST- Tris pufer z dodatkom Tweena 20,
- protitelesa;
 - primarno poliklonsko kunčje protitelo proti β - aktinu (ab8227, Abcam, Cambridge,

VB), redčitev 1 μ l Ab/ 5 ml TBST,

- primarno kunčje poliklonsko protitelo proti GCLM (ab153967, Abcam, Cambridge, VB), 2 μ l Ab/ 5 ml TBST,
- primarno kunčje poliklonsko protitelo proti GCLC (ab41463, Abcam, Cambridge, VB), 1 μ l Ab/ 5 ml TBST,
- sekundarno protitelo, usmerjeno proti IgG (H+L) kunčjih protiteles, konjugirano z encimom hrenovo peroksidazo (W401B 26824903, Promega, Madison, WI, ZDA, 603-274-4330), 1mg/ml;
- kromogen substrat I,
- kromogen substrat II.

Po prenosu western smo membrano med rahlim stresanjem 1 uro inkubirali v 5 % m/V raztopini mleka v TBST. Tako pripravljeno membrano smo nato 1 uro inkubirali z ustrezno redčenimi primarnimi protitelesi v TBST. Sledilo je trikratno 5-minutno spiranje s TBST, nato pa ponovna enourna inkubacija z 2 μ l sekundarnih protiteles v TBST. Sledilo je spiranje po enakem postopku kot po dodatku primarnih protiteles. Lise smo razkrili z dodatkom kromogenega substrata I. Ko smo ocenili, da so linije dovolj dobro vidne, smo kromogen substrat I nadomestili s kromogenim substratom II. Ko smo bili zadovoljni z izrazitostjo lis, smo odlili tudi ta substrat in membrani dvakrat sprali z bidestilirano vodo ter nato posušili. Sledilo je skeniranje (scanner HP scanjet 5400c) membran in računalniška kvantifikacija s programom ImageJ 1.83g, National Institutes of Health, ZDA.

6.3.5 Elektroforezni sistem, sistem za prenos western in računalniška oprema

Elektroforezni sistem:

- Mini Protean II minicelica, Bio-Rad, ZDA,
- PowerPack Basic usmernik, BioRad , ZDA.

Sistem za prenos western:

- Mini Protean II minicelica, Bio-Rad, ZDA,

- magnetno mešalo: Agimatic-E, P SELECTA,
- usmernik: model 200/2.0 power supply, BioRad , ZDA.

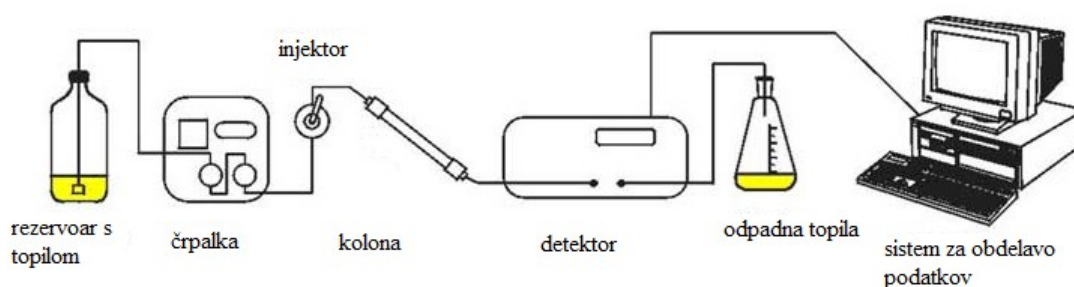
Sistem za obdelavo podatkov (kvantifikacija):

- osebni računalnik s scanerjem HP scanjet 5400c,
- programi: ImageJ 1.83g (National Institutes of Health, ZDA), Microsoft Excel 2004 (Microsoft Corporation, © 2004), Prism 5 (GraphPad Software, Inc.© 2005).

6.4 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je kromatografska tehnika, ki se pogosto uporablja v analitiki za identifikacijo in kvantifikacijo posameznih komponent v vzorcu. Ločba temelji na različnem porazdeljevanju molekul med polarno in nepolarno fazo, v odvisnosti od pKa in porazdelitvenega koeficienta spojin. Raztopino vzorca nanese na kolono, kjer potuje v toku mobilne faze pod visokim tlakom. Porazdeljevanje molekul poteka v koloni, ki je napolnjena s trdno stacionarno fazo. Komponente vzorca se v fazah zadržujejo različno dolgo, nato pa jih ob eluciji s kolone zazna ustrezeni detektor. Različni retencijski časi nam omogočajo identifikacijo vzorca, jakost signala pa kvantifikacijo. Izbira kolone, mobilne faze, detektorja in ostalih kromatografskih pogojev je odvisna od vzorca in namena dela [30].

Za vrednotenje oksidativnega stresa smo določali koncentracijo MDA, ki nastane pri hidrolizi razpadnih produktov lipidne peroksidacije. V ta namen smo uporabili HPLC metodo, ki temelji na kisli hidrolizi lipoperoksidov, prisotnih v plazmi ali mitohondrijih z razredčeno ortofosforno kislino pri temperaturi 100 °C. Glavni produkt hidrolize MDA nato tvori adukt s tiobarbiturno kislino (MDA-TBA₂), ki ga detektiramo pri valovni dolžini 532 nm. Metodo je 1987 opisal Wong v članku Lipoperoxides in Plasma as Measured by Liquid-Chromatographic Separation of Malondialdehyde-Thiobarbituric Acid Adduct [32]. V našem primeru je šlo za direkten prenos iz literature v laboratorij. Podatkov o validaciji ni na voljo.



Slika 10: Shematski prikaz HPLC [31]

6.4.1 Priprava homogenatov in priprava vzorcev za HPLC

Reagenti za homogenizacijo:

- lizatni pufer II (opisan v Dodatku),
- Protease Inhibitor Cocktail Sigma P-8340 (Sigma-Aldrich).

Vzeli smo 0,1 g vzorcev zmrznjenih jeter, ki smo jih predhodno hranili pri -80°C in jih 10-15 s homogenizirali z 1 ml lizatnega pufera II in 5 μL zmesi proteaznih inhibitorjev (Sigma P-8340) z uporabo rotor-stator homogenizatorja. Homogenat smo dvakrat sonificirali po 30 sekund pri 4°C , nato pa smo ga centrifugirali 10 min pri 75.000 rpm. Razen sonifikacije so vsi procesi potekali pri sobni temperaturi, tako pripravljene vzorce pa smo nato do uporabe hranili pri -20°C .

Reagenti za pripravo vzorcev:

- nanašalni pufer II,
- nevtralizacijska zmes.

Homogenate, ki smo jih hranili v zmrzovalniku pri temperaturi -20°C , smo odtajali pri sobni temperaturi. 50 μL homogenatov smo odpipetirali v 1450 μL nanašalnega pufera II. Tako pripravljene vzorce smo nato 60 minut greli na vodni kopeli s temperaturo 100°C in jih po tem postavili na led, dokler se niso ohladili.

Nato smo vzeli 500 μL tako pripravljene zmesi in ji dodali 500 μL nevtralizacijske zmesi. Sledilo je stresanje in 5 minutno centrifugiranje pri 12.000 rpm pri 4°C . Detekcijo je potrebno opraviti v 10

minutah po nevtralizaciji, saj je adukt (MDA-TBA₂) v nevtralnem pH nestabilen .

Na kolono smo nanesti 50 µl tako pripravljenih vzorcev.

6.4.2 Opis kromatografskega sistema

Komponente kromatografskega sistema:

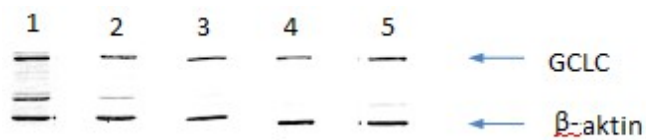
- separacijski modul: reverznofazna kolona Nova Pack C-18 (3,9x150 mm, velikost delcev 4 µm), WatersTM,
- detektor: Photodiode Array Detector, WatersTM 996, model 441,
- osebni računalnik,
- računalniški program za obdelavo kromatogramov: Millenium® 32 Chromatography Manager,
- računalniški program za preračunavanje in statistiko: Microsoft Excel 2004 (Microsoft Corporation, © 2004), Prism 5 (GraphPad Software, Inc.© 2005).

Pogoji kromatografije:

- mobilna faza;
 - fosfatni pufer pH 6,8 in acetonitril 85 w/v %,
 - acetonitril 15 w/v %;
- pretok: 1,0 ml/ min;
- čas merjenja: 3 min;
- kolona: dimenzije 150 mm x 3,9 mm (C18, 4 µl);
- temperatura kolone: 25 °C;
- valovna dolžina: 532 nm;
- volumen inicijiranja: 50 µl.

7 REZULTATI

7.1 KVANTIFIKACIJE JETRNE GCLC



Slika 11: PVDF membrana: izražanje katalitične podenote GCL

Slika 11 prikazuje reprezentativne primere lis katalitične podenote različnih eksperimentalnih skupin na PVDF membrani; 1- kontrolna skupina, 2- dieta brez vitamina A, 3- dieta brez vitamina A in aplikacijo RK, 4- dieta brez vitamina A in visokim odmerkom vitamina E, 5- dieta brez vitamina A in visokim odmerkom vitamina E ter aplikacijo RK.

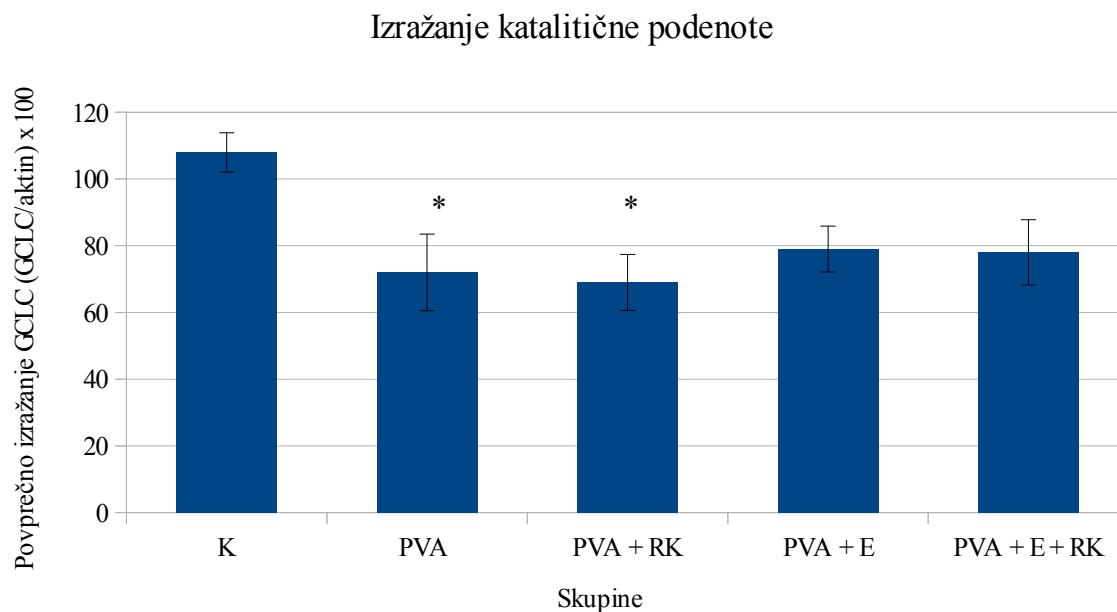
Ločba ustrezno pripravljenega homogenata (10 μ l) je potekala na 18 % SDS-poliakrilamidnem gelu. Količino katalitične podenote GCL v izoliranih vzorcih jeter smo določili semikvantitativno s primerjanjem jakosti lis encima z jakostjo aktinskih lis, pri čemer smo uporabili program ImageJ 1.83g.

Lise nad β -aktinom, ki so še posebej dobro vidne pri skupini 1 in 2, so posledica specifične vezave protiteles proti GCLC. Pri prenosu western homogenatov pljuč niso prisotne in njihova narava nam je neznana. Zaslužijo si nadaljnje raziskovanje.

Linija	Skupina živali	Povprečna vrednost [(GCL/ β -aktin) $\times$ 100] $\pm$ SD	Število meritev	Relativna jakost lis (glede na K)
1	K	108 $\pm$ 5,9	27	100,00%
2	BVA	72 $\pm$ 11,5	24	66,67%
3	BVA + RK	69 $\pm$ 8,4	25	63,39%
4	BVA + E	79 $\pm$ 6,9	12	73,15%
5	BVA + E + RK	78 $\pm$ 9,8	12	72,22%

Tabela 3: Kvantifikacija lis GCLC po prenosu western

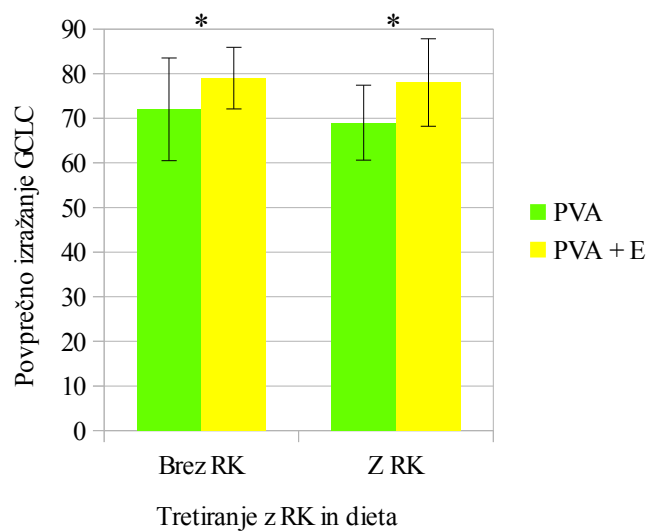
V tabeli so zbrani podatki o opravljenih meritvah: povprečno izražanje GCLC posameznih eksperimentalnih skupin s standardnimi deviacijami, podano relativno glede na hišni protein (β -aktin); število meritev in relativno izražanje GCLC, podano glede na kontrolno skupino.



Slika 12: Izražanje katalitične podenote

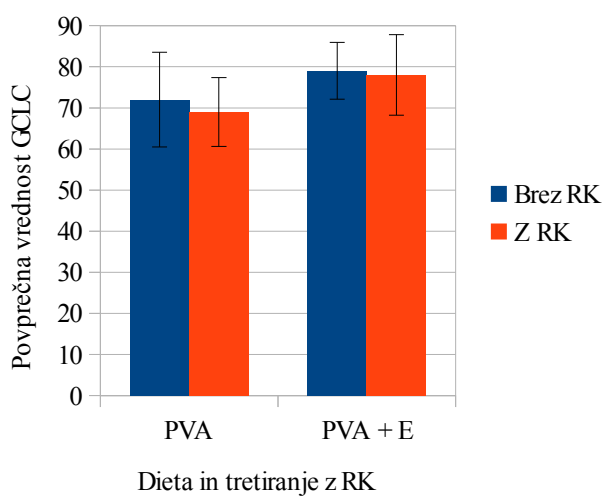
Slika 12 prikazuje relativno jakost lis po izvedbi prenosa western in detekciji proteinov. Z izvedbo Student t-testa smo potrdili prisotnost značilnih razlik v izražanju katalitične podenote GCL med kontrolno skupino in vsemi skupinami, hranjenimi z dieto brez retinola, s $p < 0,05$, na grafu označeno z *.

Vpliv vitamina E na izražanje GCLC



Slika 13: Vpliv vitamina E na izražanje GCLC

Vpliv tretiranja z RK na izražanje GCLC



Slika 14: Vpliv tretiranja z RK na izražanje GCLC

Slika 13 prikazuje značilno večje izražanje GCLC pri podganah, katerih dieta je vsebovala visoke koncentracije vitamina E, v primerjavi s podganami, ki so prejemale hrano z normalnimi koncentracijami vitamina E. Obe skupini sta bili po 60 dneh prejetja diete razdeljeni na 2 dela; prvi je bil žrtvovan takoj, drugi del skupine pa je še 10 dni prejel injekcije RK. Aplikacija RK ni značilno zmanjšala izražanja GCLC, kar prikazuje *Slika 14*. * označuje statistično pomembno razliko v nivoju izražanja GCLC s $p < 0,05$. Uporabljen je bil Student t-test.

7.2 KVANTIFIKACIJA JETRNE GCLM



Slika 15: PVDF membrana: izražanje modulatorne podenote GCL

Slika 15 prikazuje reprezentativne primere lis modulatorne podenote različnih eksperimentalnih skupin na PVDF membrani; 1- kontrolna skupina, 2- dieta brez vitamina A, 3- dieta brez vitamina A in aplikacija RK, 4- dieta brez vitamina A in visokim odmerkom vitamina E, 5- dieta brez vitamina A in visokim odmerkom vitamina E ter aplikacija RK.

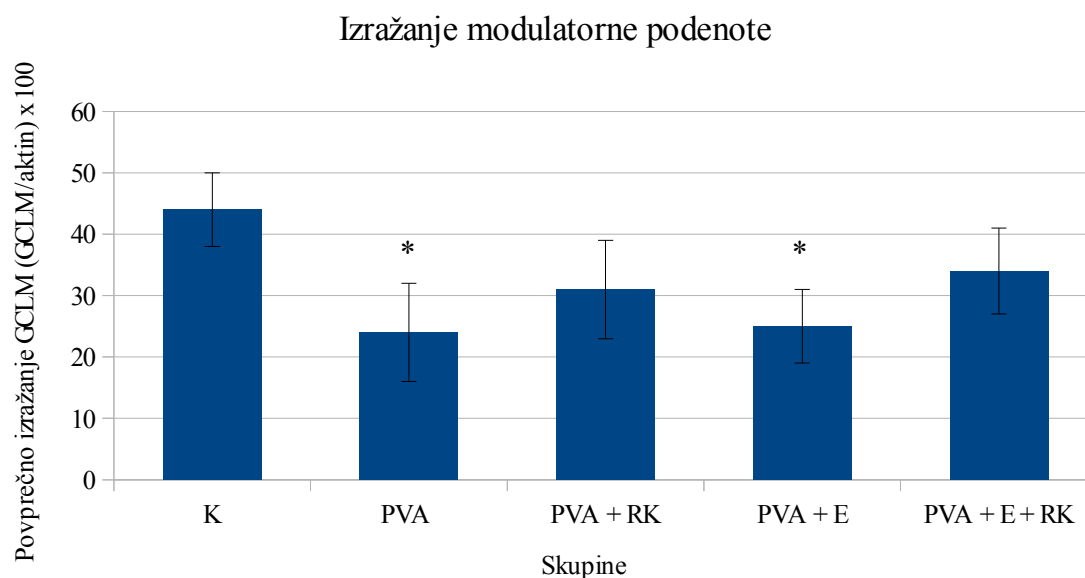
Ločba ustrezno pripravljenega homogenata (10 μ l) je potekala na 18 % SDS-poliakrilamidnem gelu. Količino modulatorne podenote GCL v izoliranih vzorcih jeter smo določili semikvantitativno s primerjanjem jakosti lis encima z jakostjo aktinskih lis, pri čemer smo uporabili program ImageJ 1.83g.

Lise med aktinom in GCLM so posledice nespecifične vezave protiteles.

Linija	Skupina živali	Povprečna vrednost [(GCL/ β -aktin) $\times$ 100] $\pm$ SD	Število meritev	Relativna jakost lis (glede na K)
1	K	44 $\pm$ 6	41	100,00%
2	BVA	24 $\pm$ 8	24	54,55%
3	BVA + RK	31 $\pm$ 8	17	70,45%
4	BVA + E	25 $\pm$ 6	8	56,82%
5	BVA + E + RK	34 $\pm$ 7	8	77,27%

Tabela 4: Kvantifikacija lis GCLM po prenosu western

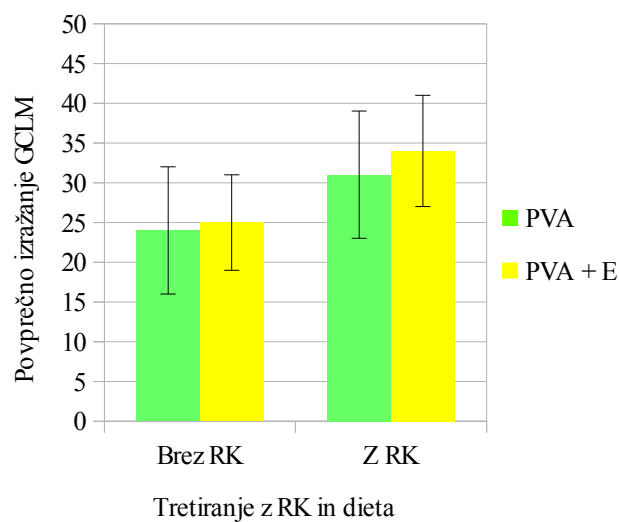
V tabeli so zbrani podatki o opravljenih meritvah: povprečno izražanje GCLM posameznih eksperimentalnih skupin s standardnimi deviacijami, podano relativno, glede na hišni protein (β -aktin); število meritev in relativno izražanje GCLM, podano glede na kontrolno skupino.



Slika 16: Izražanje modulatorne podenote

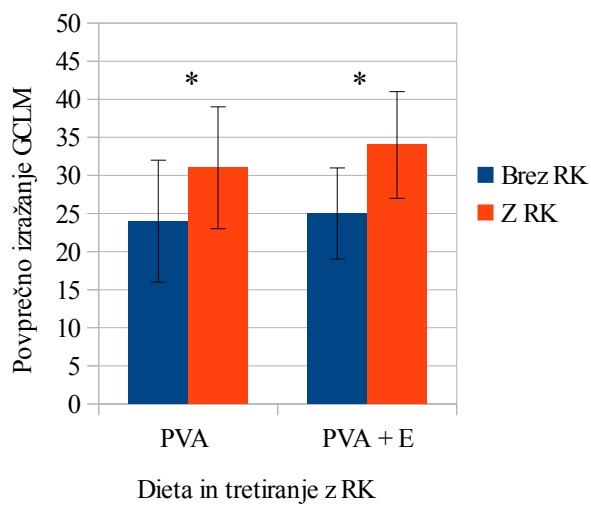
Slika 16 prikazuje relativno jakost lis po izvedbi prenosa western in detekciji proteinov. Z izvedbo Student t-testa smo potrdili prisotnost značilnih razlik v izražanju modulatorne podenote GCL med kontrolno skupino in vsemi skupinami, hranjenimi z dieto brez retinola, s $p < 0,05$, kar je na grafu označeno z *.

Vpliv vitamina E na izražanje GCLM



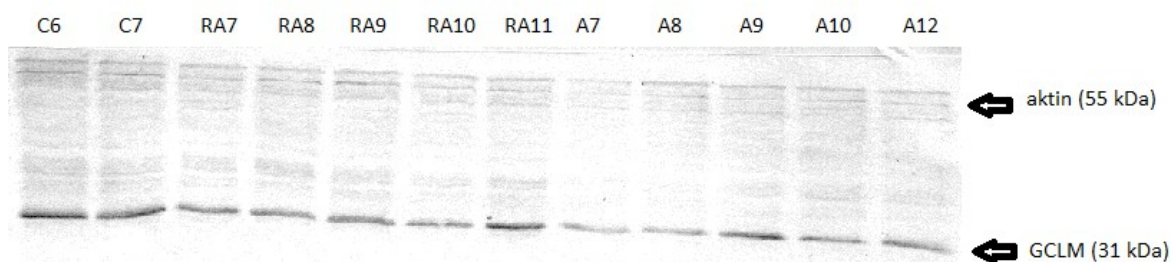
Slika 17: Vpliv vitamina E na izražanje GCLM

Vpliv tretiranja z RK na izražanje GCLM



Slika 18: Vpliv tretiranja z RK na izražanje GCLM

Slika 17 prikazuje neznačilen vpliv različnih koncentracij vitamina E na izražanje GCLM. Obe skupini živali (BVA, BVA + E) sta bili po 60 dneh prejemanja diete razdeljeni na 2 dela; prvi je bil žrtvovan takoj, drugi del skupine pa je še 10 dni prejemal injekcije RK. *Slika 18* prikazuje, da je aplikacija RK vodila v signifikantno višje izražanje GCLM v primerjavi z nivojem GCLM živali, ki so bile žrtvovane takoj. * označuje statistično pomembno razliko v nivoju izražanja GCLM s $p < 0,05$. Uporabljen je bil Student t-test.



Slika 19: Primer PVDF membrane po prenosu western in detekciji proteinov

Slika 19 prikazuje preslikavo membrane po prenosu western in detekciji proteinov.

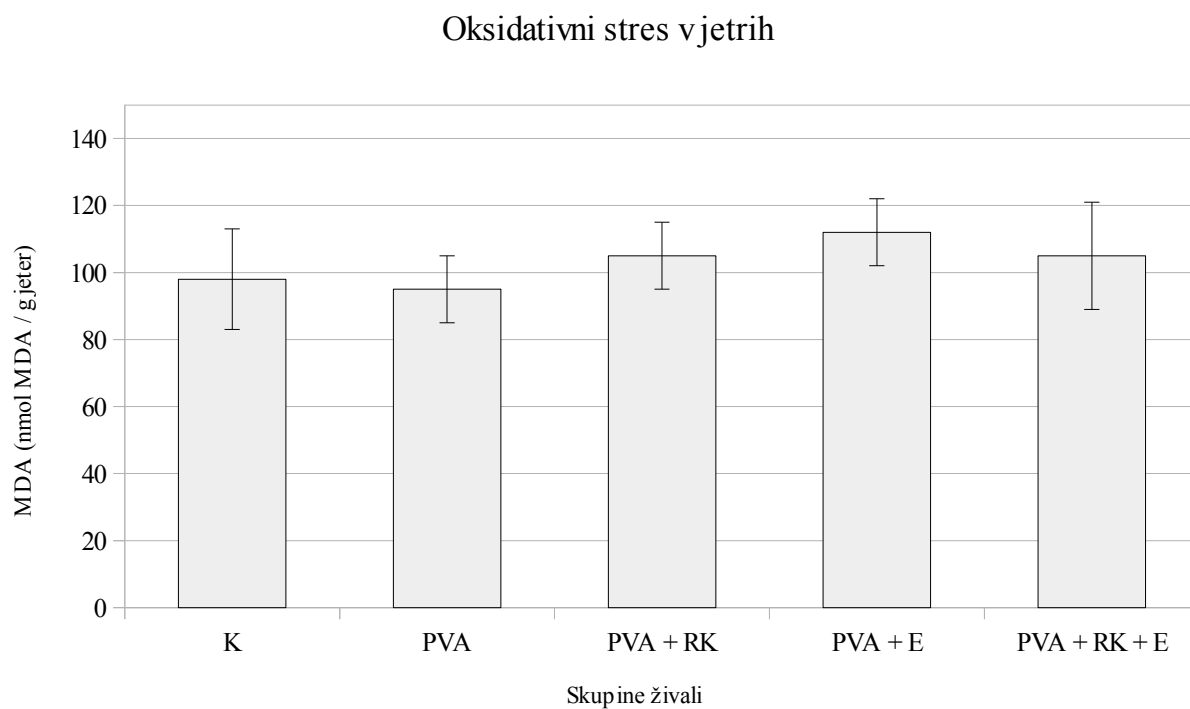
7.3 REZULTATI HPLC

Skupina	Vrednost	SD	N
K	98	15	3
PVA	95	10	3
PVA + RK	105	10	3
PVA + E	112	10	3
PVA + RK + E	105	16	3

Tabela 5: Povprečne vrednosti MDA, standardne deviacije in število meritev

Za določitev oksidativnega stresa v jetrih, smo merili razpadni produkt, ki nastaja v procesu lipidne peroksidacije: MDA. Za meritev absorbance je bilo potrebno tvoriti adukt MDA-TBA₂ z absorpcijskim maksimumom pri valovni dolžini 532 nm. 50 µl ustrezno pripravljenih vzorcev smo nanесли na reverznofazno kolono HPLC. V tabeli so zbrani statistično obdelane absorbance MDA-TBA₂ pri retencijskem času 3 min. Meritve niso pokazale statistično značilnih razlik med

skupinami.



Slika 20: Oksidativni stres v jetrih

MDA predstavlja merilo oksidativnega stresa. Meritve niso pokazale signifikantnih razlik ($p < 0,5$) v nivoju MDA med posameznimi skupinami in kontrolno skupino, kot prikazuje *Slika 20*.

8 DISKUSIJA

Raziskava je dala nepričakovane rezultate: znižano ekspresijo obeh GCL podenot in nespremenjene ravni oksidativnega stresa v jetrih.

V diskusiji bom osvetlila potencialne mehanizme, ki so pripeljali do tega, in ovrednotila naše rezultate s pomočjo že znanih dognanj o vplivu oksidativnega stresa na jetra.

Diskusija je razdeljena na dva dela: prvi je posvečen HPLC meritvam in razpravlja o vplivu retinoidov in α -tokoferola na oksidativni stres; drugi je osredotočen na vpliv oksidativnega stresa in AO na GCL.

8.1 ANALIZA REZULTATOV HPLC

S HPLC smo merili koncentracijo MDA v homogenatih podganjih jeter. MDA je eden izmed končnih produktov lipidne peroksidacije in je kot tak pogosto uporabljen kot pokazatelj oksidativnega stresa, ki mu je izpostavljeno tkivo.

Meritve niso pokazale statistično značilnih razlik med skupinami, kljub temu da so številni avtorji opisali vplive vitamina A in E na stanje jetrnega tkiva in da velja, da vodi PVA v povišano stopnjo lipidne peroksidacije.

8.1.1 Povezava PVA z oksidativnim stresom

Kot opisano v uvodu, so antioksidativne lastnosti značilne za vse derivate retinola [7]. Predpostavlja se, da je v primeru PVA, zmanjšana antioksidativna obramba glavni vzrok za nastanek poškodb tkiv. V podganjih pljučih, izpostavljenih ROS, PVA zmanjša koncentracije GSH in aktivnost GST [33], v jetrih pa povzroči nastanek oksidativnega stresa [6].

Študija, v kateri so preučevali kopitarje, živeče na območju rudnika svinca (vir oksidativnega stresa), je pokazala, da so imele te živali značilno nižje koncentracije jetrnih retinilnih estrov. To kaže na njihovo interno rabo za vzdrževanje tkivne integritete. Raven prostega retinola, ki naj bi bil še posebej pomemben AO, je bila v jetrih teh kopitarjev zvišana, kar kaže na mobilizacijo vitamina A kot pomemben odziv na oksidativni stres [34].

Ni jasno, ali je PVA odgovorno za povišano raven oksidativnega stresa zaradi manjkajoče

antioksidativne zaščite ali zaradi negativnega vpliva, ki ga ima na raven GSH. Alisi in sod. [35] so v svojem eksperimentu ugotovili, da je MDA premo proporcionalen stopnji lipidne peroksidacije in obratno sorazmeren koncentraciji GSH, ki se porablja za nevtralizacijo ROS. Ko ROS presežejo zaščitne zmožnosti GSH, se peroksidacija poveča [35].

Kakor koli, glede na številne študije je bil v kontrolni skupini pričakovan povečan oksidativni stres v jetrih (višja raven MDA) in histološke spremembe tkiva, povezane s fibrogenezo. Skladno s tem smo opazili, da se je v jetrih vseh živali, ki v prehrani niso imele vitamina A, pojavila steatoza. Nasprotno je analiza s HPLC pokazala, da skupina podgan BVA ni doživljala znatno povečanega oksidativnega stresa, saj se koncentracija MDA ni značilno razlikovala od kontrolne skupine. To je v nasprotju z znano antioksidativno vlogo, ki jo igra retinol, in z drugimi raziskavami, ki so pokazale, da je PVA odgovorno za oksidativni stres in zmanjšanje koncentracij GSH, torej dvema stanjema, povezanim s povečano lipidno peroksidacijo in zvišanimi ravni MDA.

8.1.2 Vpliv vitamina E na oksidativni stres

Glavna naloga vitamina E je zaščita polinenasičenih maščobnih kislin, saj reagira z lipidnimi peroksilnimi radikali ($\text{LOO}^\cdot$) in tako prepreči iniciacijo verižne peroksidacije. Deluje torej kot AO [1][9].

V študiji, kjer so podganam aplicirali Cr(VI), ki je povzročil produkcijo radikalov in značilno zvišal lipidno peroksidacijo v jetrih (zvišala se je koncentracija MDA), je koadministracija vitamina E vodila v pomembno jetrno zaščito v vseh pogledih: manjše spremembe tkiva, nižja lipidna peroksidacija, višja antioksidativna zaščita, nižji kazalci, ki kažejo na oksidativni stres [36]. Več drugih študij je pokazalo, da aplikacija vitamina E lahko poviša [37] plazemske koncentracije GSH ali prepreči njihov upad [17][33][36] in tako okrepi obrambo pred oksidativnim stresom. Pomanjkanje vitamina E zmanjša aktivnost jetrne katalaze, GPx in GR in povzroči lipidno peroksidacijo v jetrih, ki pa jo lahko povrnemo v prvotno stanje s prehranskimi dodatki vitamina E [38].

Ob predpostavki, da PVA poveča oksidativni stres, smo glede na zgoraj citirane raziskave pričakovali, da ga bo tokoferol ublažiti. Naša hipoteza je bila, da bosta skupini, ki sta namesto

retinola s hrano prejemali visoko koncentracijo tokoferola, imeli nižje kazalce lipidne peroksidacije (MDA). Meritve tega niso potrdile, saj se skupini BVA+E in BVA+RK+E nista značilno razlikovali od nobene druge skupine. Ob dejstvu, da PVA ni povzročilo povečanega oksidativnega stresa (poskusne živali so domnevno imele fiziološke pogoje), si lahko rezultate razložimo s pomočjo študije, ki so jo naredili Hamre in sod [39]. Ta je pokazala, da ima v normalnih pogojih spreminjanje diete (ki je vsebovala različne koncentracije oksidantov, AO in drugih hranil) le majhen vpliv na tkivne in plazemske koncentracije GSH. Različne količine vitamina E niso vplivale ne na stopnjo GSH ne na razmerje GSH/GSSG, kar kaže na veliko pufrno kapaciteto endogenega redoks stanja, ko pride do variacij v prehranskih AO [39].

Prav tako bi lahko odsotnost značilnih razlik pri dietah z visoko vsebnostjo tokoferola razložili z njegovo manjšo učinkovitostjo pri nižjem parcialnem tlaku, ki je pri fizioloških pogojih prisoten v tkivih [9], ali pa s preseženim pragom absorpcije; za privzem vitamina E je namreč odgovoren vezavni protein tipa B I (SRBI) in znano je, da zanj tekmujejo številne spojine, kot so karotenoidi in polifenoli, ter tako motijo absorpcijo vitamina E [40]. Visoke količine tokoferola *per os* tako morda sploh niso vplivale na njegove plazemske koncentracije. Za potrditev tega bi morali izmeriti njegove plazemske koncentracije.

8.1.3 Vpliv RK na oksidativni stres

RK je odgovorna za številne fiziološke in farmakološke učinke, ki so uravnavani preko receptorjev ali preko mehanizmov, ki ne vključujejo receptorjev. Kateri mehanizem je vpleten v antioksidativno delovanje RK, ostaja nejasno [10], jasno pa je, da RK sama po sebi poseduje antioksidativne lastnosti, ki so podobne retinolu, vendar izrazito šibkejše [8]. Conte de Frota in sod. [10] so opazili, da RK v fizioloških koncentracijah (4-14 nM) poveča aktivnost encimov, vpletenih v antioksidativno delovanje. In vitro je RK v Sertoli celicah povečala aktivnost CAT, SOD in GPx, v hondrocitih pa poleg tega še aktivnost GR ob sočasnem znižanju koncentracije GSH. Zmanjšala se je lipidna peroksidacija in poveča celična viabilnost [10].

Pričakovali smo, da bosta imeli skupini poskusnih živali, ki so jima aplicirali all-trans-RK (BVA+RK, BVA+RK+E) na račun njenih (sicer šibkih) antioksidativnih lastnosti znižano koncentracijo MDA, vendar se nista značilno razlikovali od drugih poskusnih skupin (niti od K, niti od BVA). Kot rečeno, ni znano, ali ti rezultati odražajo dejansko stanje. Poznavanje aktivnosti GR

in GPx ter koncentracije GSH, bi nam, če bi bili prvi dve povišani, zadnja pa znižana, omogočilo sklepati na enako dogajanje, kot ga je opisal Conte de Frota s sod. [10].

V skupini BVA+RK+E smo pričakovali aditivne učinke obeh AO in zato najnižjo stopnjo oksidativnega stresa, morda primerljivo s kontrolno skupino. Kot omenjeno že prej pa meritve tudi v tej skupini niso pokazale značilno spremenjene MDA koncentracije.

Naše meritve lipidne peroksidacije torej niso mogle potrditi, da PVA prispeva k spremenjenemu oksidativnemu statusu organizma, še manj pa, ali ga AO v prehrani (vitamin E) ali naknadno tretiranje z njimi (RK) lahko zmanjšajo. Kljub temu, da si študije še niso enotne, kakšen vpliv imajo vitamin A, E in RK na organizem, se vsekakor zdi nenavadno, da se ravni lipidne peroksidacije ne bi spremenile ob tako ekstremnih pogojih, kot je popolna odsotnost retinola v prehrani, in da bi ostale enako neodzivne tudi ob različnih stimulih, kot sta bila tokoferol in RK. Za pojasnitev tega fenomena, bodo potrebne nadaljnje raziskave.

8.1.4 Možni vzroki za nepričakovane rezultate

To nenavadno obnašanje bi lahko pojasnili z napako v metodi, ker podatki o validaciji niso bili na voljo. Kromatografska določitev koncentracije MDA s HPLC je standardni postopek ocenjevanja lipidne peroksidacije. Meritve smo ponovili trikrat in vedno dobili podobne rezultate, kar kaže na ponovljivost metode.

Če so HPLC meritve pravilne, bi to pomenilo, da vitamina A in E ter RK dejansko niso vplivali na stopnjo oksidativnega stresa v jetrih, a so vendarle vplivali na izražanje GCL podenot (glej Rezultati). Zdi se, da je večina aktivnosti, povezanih z vitaminom A in E, ter transkripcijskih dejavnikov, ki se vežejo na promotorje GCL genov, povezanih z antioksidativnim delovanjem ali redoks ravnovesjem. Vemo pa, da ima poleg pro-/anti-oksidativnega delovanja, RK tudi vlogo liganda, ki se veže na RAR in RXR nuklearne receptorje in tako vpliva na transkripcijo genov.

Geni, regulirani s strani RAR in RXR receptorjev, so v večini vpleteni v razvoj živčevja, kardio-vaskularnega sistema, skeletnega mišičja ter oči in torej še posebno pomembni v razvoju embrija [41]. Retinoidni X receptor α (RXR α) regulira GCLC in GS, ni pa še znano, kako. RXR α je najpogostejši izotip RXR receptorja v jetrih in je pomemben pri regeneraciji jeter. Miši z izbitim genom za ta receptor so imele nižjo raven GSH ter nižjo raven ekspresije GCLC in GS [13] in so torej bolj dovzetne za oksidativni stres. Ker je vitamin A starševska molekula RK [5], je očitno, da

PVA prizadene tudi koncentracijo RK. Pomanjkanje RK, ki pripomore h kontroli oksidativnega stresa tudi preko regulacije transkripcije genov GCLC in GS, bi torej načeloma morala oksidativni stres le še poslabšati, ne pa ga ohranjati na fiziološki ravni, primerljivi s kontrolno skupino, kar je v nasprotju z našimi HPLC meritvami.

Znano je tudi, da PVA zmanjša ekspresijo genov, vpletenih v mitohondrijsko oksidacijo maščobnih kislin v jetrih, medtem ko tretiranje z RK zviša kapaciteto jeter za lipidno oksidacijo [42] in stimulira nastajanje polinenasičenih maščobnih kislin, ki so zelo dovzetne za oksidacijo [10]. PVA bi torej lahko zmanjšalo endogeno produkcijo ROS in tako prispevalo k ohranjanju nizke ravni oksidativnega stresa. Vendar bi, če je vpleten ta mehanizem, v skupini BVA+RK pričakovali povišano raven MDA, v BVA+RK+E pa zaradi zaščitne vloge vitamina E nižjo raven MDA v primerjavi s BVA+RK.

Obstajajo tudi druge možne razlage, ki bi pojasnile odsotnost signifikantnih razlik v stopnji oksidativnega stresa med različnimi skupinami. Jetra bi lahko bila boljše zaščitena pred oksidativnim stresom ali pa manj občutljiva na PVA in se posledice slednjega v času eksperimenta še niso manifestirale.

8.2 ANALIZA REZULTATOV PRENOSA WESTERN

Ker podatkov o validaciji HPLC ni na voljo, ne vemo, kakšna je bila stopnja oksidativnega stresa v jetrih živali in v kolikšni meri so nanj vplivali PVA, vitamin E in RK.

V nasprotju s pričakovanji so rezultati prenosa western pokazali znižanje obeh podenot GCL v vseh skupinah v primerjavi s kontrolno skupino.

Večina literature si je enotna o vplivu oksidativnega stresa na encime, vpletene v antioksidativne dejavnosti: ta bodisi poveča njihovo aktivnost bodisi ekspresijo. Za obe podenoti GCL so znani podatki o pozitivnem učinku oksidativnega stresa na njuno ekspresijo, naše meritve pa so v nasprotju s tem pokazale manjšo ekspresijo GCL podenot.

8.2.1 Možni vzroki za nespremenjeno oziroma zmanjšano ekspresijo GCL

Najočitnejša je odsotnost oksidativnega stresa, na katero so kazale naše HPLC meritve. Ta bi sicer pojasnila pomanjkanje odziva pri ekspresiji GCL, vendar se je slednja znižala, kar kaže, da je moral biti prisoten nek drugi dejavnik, ki je povzročil odklon od normalnega stanja.

Druga možnost je, da se ni povečala ekspresija GCL, pač pa aktivnost encima. Za potrditev te hipoteze bi morali bodisi meriti aktivnost GCL bodisi količino produkta, GSH. Morda so bile vpletene posttranskripcijske modifikacije, ki bi lahko naredile GCL učinkovitejši, ne da bi povečale njegovo koncentracijo v jetrih [20]. Poznavanje količine celokupnega GSH in razmerja GSH/GSSG bi nam poleg podatka o aktivnosti GCL veliko povedalo tudi o stopnji oksidativnega stresa.

Tretja možnost, ki bi pojasnila upad ekspresije GCL, je bila opisana v članku o njeni vlogi pri nekrotičnem pankreatitisu (Pereda in sod.) [43]. Kljub aktivaciji signalnih poti ERK in vezavi RNA-polimeraze II na promotorje genov se raven GSH in mRNA podenot GCL ni povišala. Vzrok za to je bila povišana aktivnost citosolne ribonukleaze, ki je neselektivno razgrajevala mRNA v celici. Ribonukleaza A je pri fizioloških pogojih neškodljiva zaradi prisotnosti ribonukleaznega inhibitorja v citosolu. Ker ta vsebuje številne cisteinske ostanke je možno, da je sprememba redoks potenciala zaradi spremenjenega GSH ravnovesja povzročila oksidacijo tiolnih skupin, s tem pa inaktivacijo in degradacijo inhibitorja, ki je sprostil ribonukleazo [43]. Za potrditev te hipoteze bi morali narediti PCR analizo v realnem času, morda pa bi opazili tudi histološke spremembe, saj degradacija zajema vse celične proteine.

8.2.2 Pregled vpliva oksidativnega stresa in antioksidantov na ekspresijo GCL

Oksidativni stres zaradi ROS ali HNE povzroči začetno znižanje koncentracij GSH, ki je povezano s povečano tvorbo GSSG. Temu v roku 24 ur sledi povečanje koncentracij GSH ob sočasnem povečanju ravni mRNA GCL [44][45]. Sočasna indukcija obeh podenot je pomemben mehanizem obrambe pred oksidativnim stresom. Ob izpostavljenosti celic neletalnim dozam oksidantov se lahko razvije adaptacijski antioksidativni celični odziv, ki ščiti celice pred nadaljnjo izpostavitvijo oksidativnemu stresu.

Fenolni AO so v humanih endotelnih in nekaterih drugih celicah povečali ekspresijo obeh GCL podenot. Ta učinek je povezan z AP-1 transaktivacijo in kaže, da imajo poleg sposobnosti reagirati z

radikali, AO tudi sposobnost povišati ekspresijo GCL in tako koncentracijo GSH, kar seveda vodi v dodatno zaščito pred oksidanti [44].

Tretiranje/pogoji	Vpliv na GCLC	Vpliv na GCLM
Oksidativni stres (HNE)	↑ transkripcija ↑ mRNA stabilizacija	↑ transkripcija ↑ mRNA stabilizacija
Antioksidanti	↑ nivo mRNA	?
Raven GSH	?	?
TGF-β1	↓ transkripcija	?

Tabela 6: Pregled pogojev/tretiranja in njihovega vpliva na GCLC in GCLM [46]

8.2.2.1 Vpliv HNE na ekspresijo GCL

4-hidroksinonenal, HNE, nastaja pri oksidaciji n-6 polinenasičenih maščobnih kislin, med katerimi sta najpogostejši arahidonska in linolna kislina. HNE ima 3 reaktivne funkcionalne skupine in v visokih koncentracijah vodi v celično smrt [47].

Celična obramba pred HNE vključuje njeno konjugacijo z GSH, ki jo medira GST, vendar je ta proces nepovraten in zmanjša stopnjo znotrajceličnega GSH [48]. Manjše koncentracije GSH vodijo v nižjo aktivnost GST [35], kar ob visokih koncentracijah HNE pripelje do celičnih poškodb.

Pred kratkim je bilo dokazano, da HNE v normalnih plazemskih koncentracijah inducira GCLC, kar nakazuje, da je bazalna raven ekspresije GCLC regulirana s produkti lipidne peroksidacije. Prav tako HNE inducira GCLM, čeprav kaže, da se signalne poti pri patoloških in fizioloških koncentracijah HNE razlikujejo. Pri slednjih je za indukcijo, povzročeno s HNE, nujna Nrf2 signalizacija [13], sicer pa signalne poti, na katere vpliva HNE, najverjetneje vključujejo aktivacijo kinaz, ki so vpletene v regulacijo aktivator proteina-1 (AP-1), na redoks občutljivega transkripcijskega faktorja [47].

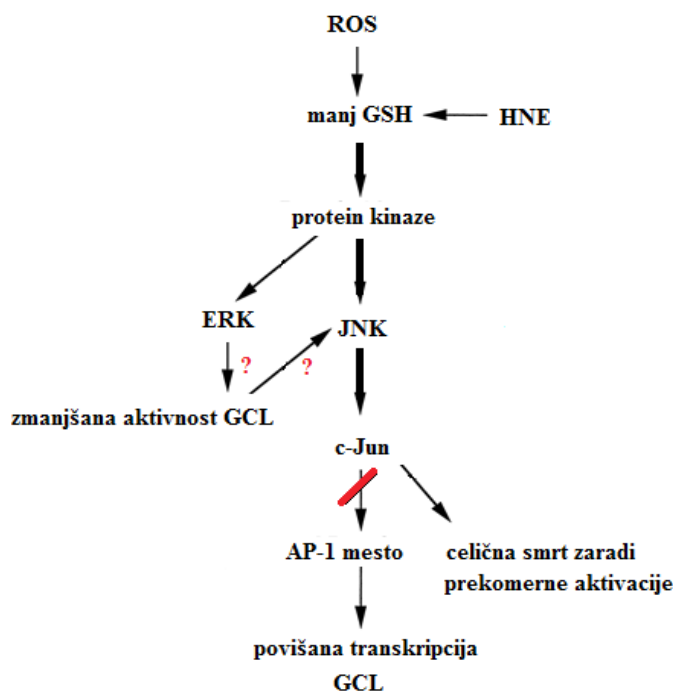
Singh in sod. [48] so naredili raziskavo o vplivu kroničnega oksidativnega stresa (ki je bil povzročen s prekomerno ekspresijo CYP2E1, ki je prooksidativni encim) in tretiranju takih celic s HNE. V celicah s povečano endogeno produkcijo ROS je bila raven HNE pred tretiranjem s HNE enaka kot v kontrolnih celicah, aktivnost GCL pa blago, a značilno znižana in je po tretiranju s HNE še upadla, kar je vodilo v večji upad GSH kot pri kontrolnih celicah.

Zakaj so se celice na povišano endogeno sintezo odzvale z zmanjšano aktivnostjo GCL, ostaja

neznano. Presenetljivo je, da bi celice s povišano produkcijo ROS zavrle antioksidativno pot, za katero je pričakovano, da bo povišana kot kompenzatorni odgovor na kronični oksidativni stres. Avtorji so kot možno razlago navedli zvišano ERK1/2 signalizacijo, ki jo razvijejo celice, kronično stimulirane s potencialno ogrožajočim ROS. Ta jih ščiti pred oksidativnim stresom [49], vendar jih naredi bolj občutljive na smrt, inducirano z maščobnimi kislinami, ter kot kaže vodi tudi v nadaljnji upad GCL aktivnosti [48].

Po že znižani aktivnosti GCL, je raven GSH v celicah s povišano endogeno produkcijo ROS, še padla po tretiranju s HNE. To je vodilo v prekomerno signalizacijo JNK/c-Jun, s katero so celice želele povečati transkripcijsko aktivacijo AP-1 promotorja GCL gena, a je vodila v celično smrt [48][49]. Učinek znižane koncentracije GSH se je pojavil nad ravniyo JNK in ERK.

HNE torej ni le biomarker jetrnega oksidativnega stresa, ampak aktiven mediator hepatocelularnih poškodb preko JNK signalizacije [48].



Slika 21: Prikaz signalne poti, ki vodi v celično smrt zaradi prekomerne aktivacije JNK, ki jo povzroča kronični oksidativni stres.

ROS in HNE znižata koncentracijo GSH, kar aktivira protein kinaze. Te sprožijo ERK signalizacijo, ki morda vodi v znižanje aktivnosti GCL, in JNK signalizacijo, ki bi lahko ob prekomerni stimulaciji morda vodila v celično smrt namesto v zvišanje ekspresije GCL. ROS: reaktivne kisikove zvrsti. HNE: 4-hidroksinonenal, produkt lipidne peroksidacije. ERK, JNK: z mitogenom aktivirani protein kinazi. C-Jun: del homo- ali hetero-dimera AP-1. AP-1: aktivacijski protein 1, transkripcijski faktor, ki se veže na AP-1 vezavno mesto v promotorju.

Če primerjamo to raziskavo z našo, lahko potegnemo nekaj vzporednic. Enako kot celice, ki so imele povišano endogeno sintezo zaradi oksidativnega citokroma, so bile tudi naše celice domnevno izpostavljene podaljšanemu oksidativnemu stresu. Morda so se na kronični oksidativni stres, ki ga je povzročalo PVA in je povišalo koncentracijo HNE, odzvale s povečano ERK signalizacijo, ki vodi v preživetje, vendar zniža aktivnost GCL. Ker v našem eksperimentu nismo merili aktivnosti GCL, ne moremo vedeti, če so se naše poskusne živali odzvale podobno. Znižana raven ekspresije GCL, ki smo jo zaznali, bi po tej teoriji lahko bila posledica povečane celične smrti zaradi prekomerne JNK signalizacije in vpletenosti ERK poti. Z določitvijo stopnje vpletenosti ERK in stopnje smrti hepatocitov, bi lahko potrdili, da so v naših organizmih potekali podobni procesi, kot

so jih opisali Singh in sod [48].

8.2.2.2 Vpliv PVA, RK in vitamina E na ekspresijo GCL

- PVA lahko zmanjša koncentracijo GSH in aktivnost GST v podganjih pljučih, izpostavljenih kisiku [33]. Ob predpostavki, da enako velja za hepatocyte in je bila tudi pri naših poskusnih živalih raven GSH znižana (morali bi opraviť meritve koncentracij GSH), bi lahko ta pojav razložili z upadom ekspresije obeh GCL podenot. Zakaj PVA vodi v znižano koncentracijo GSH ostaja odprto vprašanje, saj je to v nasprotju z interesom organizma, da se na povečan oksidativni stres odzove s produkcijo spojin, ki ta stres nevtralizirajo. Ena izmed možnosti bi bila, da je ekspresija GCL genov vezana na signalizacijo jedrnih RAR in RXR receptorjev, katerih ligand je RK. Ker se je po tretiranju z RK povečala le ekspresija GCLM, se RARE vezavni element morda nahaja samo v promotorju te podenote.
- Podganam smo aplicirali fiziološke doze RK, ki naj bi zmanjšale koncentracijo GSH in lipidno peroksidacijo [10]. Ni znano, kaj je vzrok znižane ravni GSH v tej raziskavi, lahko bi jo povzročila manjša ekspresija GCL, lahko pa bi bila zanjo odgovorna tudi zmanjšana aktivnost GCL, omejenost cisteina, povečana tvorba ireverzibilnih kompleksov z GSH itd. Ob analizi vpliva, ki ga je imela RK na GCL v našem eksperimentu, vidimo, da je njena aplikacija (skupini BVA+RK, BVA+RK+E) značilno povečala ekspresijo GCLM podenote v primerjavi z netretiranimi živalimi (BVA, BVA+E), vendar jih ni povrnila v prvotno raven (K).

Na ekspresijo GCLC podenote RK ni imela vpliva; primerjava dvojic BVA z BVA+RK ter BVA+E z BVA+E+RK kaže, da se med seboj ne razlikujejo.

Če je bil za znižanje ravni GSH, ki ga je opazil Conte de Frota [10], odgovoren GCL, se glede na naše rezultate zdi, da je morala RK negativno vplivati na aktivnost GCL, saj ni spremenila ekspresije GCLC, ki je odgovorna za sintezo GCL (para BVA / BVA+RK in BVA+ E / BVA+E+RK se med sabo ne razlikujeta signifikantno), in je povišala ekspresijo GCLM, ki poveča aktivnost GCLC (para BVA/BVA + RK in BVA + E/BVA + E +RK se med seboj signifikantno razlikujeta). To bi kvečjemu vodilo v povišano koncentracijo GSH. Da bi izvedeli, če je RK na naše poskusne živali res vplivala podobno, kot je opisal Conte de Frota, bi morali zmeriti koncentracijo GSH in MDA, z meritvijo aktivnosti GCL pa bi lahko

potrdili, da je za upad ravni GSH odgovorna znižana aktivnost GCL in ne zmanjšanje njene ekspresije.

Mehanizem antioksidativnega delovanja RK ostaja nejasen: morda so za zmanjšanje lipidne peroksidacije odgovorne njene antioksidativne lastnosti, za povečanje ekspresije GCLM pa njeno delovanje kot jedrni faktor.

Znano je, da retinoidni X receptor α (RXR α) regulira GCLC in GS, ni pa še znano, kako. Miši z izbitim genom za ta receptor so imele 50 % nižjo raven jetrnega GSH zaradi 40 % nižje sposobnosti za njegovo sintezo. Ta je bila posledica kombinacije 50 % nižje ravni GCLC mRNA in 30 % nižje ravni GS mRNA, medtem ko je raven GCLM mRNA ostala nespremenjena [13].

Neskladno z zgoraj navedeno raziskavo, v našem eksperimentu RK ni imela nobenega vpliva na ekspresijo GCLC (BVA se ni značilno razlikovala od BVA+RK, BVA+E pa ne od BVA+E+RK). Eden izmed razlogov, ki bi pojasnil neodzivnost GCLC podenote, je, da je v indukcijo njene transkripcije vpleten RXR. Ta se odziva le na 9-*cis* RK [11], medtem ko so bile v našem eksperimentu poskusne živali tretirane z ATRA. Če bi želeli izničiti negativne učinke PVA na GCLC, bi, kot kaže, morali uporabiti 9-*cis* RK. Treba bi bilo opraviti nadaljnje raziskave, s katerimi bi potrdili učinke 9-*cis* RK in RXR α na ekspresijo GCLC.

Nasprotno se je po tretiranju z RK značilno povišala ekspresija GCLM (BVA in BVA+RK se med seboj značilno razlikujeta, enako velja za par BVA+E in BVA+E+RK). Že narejene raziskave so izključile možnost vpletenosti RXR α v nadzor ekspresije GCLM [13], poleg tega pa je prišlo do odziva po tretiranju z ATRA, kar kaže na vpletenost RAR receptorjev. Z dodatnimi raziskavami bi lahko potrdili obstoj RARE mesta v promotorjih GCL podenot, to pa bi pojasnilo upad ekspresije GCL ob pomanjkanju vitamina A, iz katerega nastaja RK.

- Nekatere študije so pokazale, da imajo poleg sposobnosti reagirati z radikali AO tudi sposobnost, da povišajo ekspresijo GCL in tako koncentracijo GSH, kar vodi v dodatno zaščito pred oksidanti. Raziskave si niso enotne, ali so AO sposobni inducirati le GCLC podenoto [46] ali lahko fenolni AO povečajo ekspresijo obeh GCL podenot. Ta učinek pripisujejo AP-1 transaktivaciji [44].

Skladno z zgornjimi raziskavami je naš poskus pokazal, da vitamin E poviša ekspresijo

GCLC (BVA+E, BVA+RK+E) v primerjavi s skupinama, katerih prehrana ni vsebovala visoke vsebnosti vitamina E (BVA, BVA+RK). Kaže, da lahko vitamin E do neke mere nadomesti vitamin A pri obvladovanju oksidativnega stresa in poviša ekspresijo GCL, verjetno pa ne more pokriti celotnega spektra funkcij, ki ga opravlja vitamin A. Kljub temu vitamin E, zaradi svoje prisotnosti v širokem naboru hrane, morda ponuja delno rešitev problematike PVA v revnih državah.

9 SKLEP

Če povzamemo rezultate, HPLC analiza ni pokazala povišanega oksidativnega stresa pri nobeni skupini živali, kar se ne sklada z znanimi učinki PVA na jetra. Prenos western je v nasprotju s pričakovanji pokazal značilno znižanje obeh podenot GCL v vseh skupinah.

Velja, da PVA poviša oksidativni stres, vitamin E in RK pa ga znižata. Pri tem vitamin E deluje kot AO in kot induktor ekspresije GCL ter s tem sinteze GSH, delovanje RK pa bi lahko bila posledica njenih antioksidativnih lastnosti ali delovanja na jedrne receptorje. Naše meritve lipidne peroksidacije niso pokazale značilnega odstopanja med različnimi skupinami, zato bi jih bilo potrebno pred končnimi zaključki ponoviti.

Na povišan oksidativni stres se organizem odzove s povečano transkripcijo ali aktivnostjo encimov, ki posedujejo antioksidativno delovanje. Znižanje ekspresije GCL, ki smo ga opazili pri živalih s PVA, bi lahko razložili s povišano aktivnostjo encima ali nespecifično razgradnjo njegove mRNA. Prav tako bi lahko bil vzrok znižane ekspresije celična smrt, ki jo povzroči prekomerna aktivacija JNK signalizacije zaradi dolgotrajno zvišane lipidne peroksidacije, morda pa je za znižanje ekspresije GCL odgovorno pomankanje RK v vlogi transkripcijskega faktorja.

Pri našem delu ostaja še veliko prostora za dodatne raziskave. Med njimi so na primer meritve plazemskih koncentracij vitamina E in GSH, razmerja GSH/GSSG ter aktivnosti GCL. Pri ponovitvi eksperimenta bi lahko povečali skupine poskusnih živali in uvedli novo skupino, tretirano z 9-*cis* RK. Zaradi kompleksnosti procesov, ki potekajo v organizmu, bo, da bi bolje razumeli procese, povezane z retinoidi, vitaminom E ter sintezo GSH, potrebnega še veliko dela. Prav tako pa nam pomembna vloga, ki jo igra oksidativni stres pri boleznih današnjega časa, ter veliko število različnih antioksidantov in encimov, ki sodelujejo pri obrambi pred njim, odpirajo praktično neskončne možnosti za nadaljnje raziskave.

10 LITERATURA

- [1] Osredkar J: Oksidativni stres. Zdravniški Vestnik 2012; 81: 393–406.
- [2] Mishra SK, Kim MK: Vitamin A and Cancer Risk. Vitamin A and Carotenoids; Chemistry, Analysis, Function and Effects; RCS Publishing, Cambridge, 2012: 485-500.
- [3] Lin JH, Liu KY: Vitamin A in The Context of Other Vitamins and Minerals. Vitamin A and Carotenoids; Chemistry, Analysis, Function and Effects; RCS Publishing, Cambridge, 2012: 23-38.
- [4] Pridobljeno iz: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Retinol.png>, 5. 3. 2014.
- [5] Woollard G: Retinol, Retinoic Acid, Carotens and Carotenoids: Vitamin A Structure and Terminology. Vitamin A and Carotenoids; Chemistry, Analysis, Function and Effects; RCS Publishing, Cambridge, 2012: 3-22.
- [6] Barber T, Esteban-Pretel G, Pilar Marín M, Timoneda J: Vitamin A Deficiency: An Overview. Vitamin A and Carotenoids; Chemistry, Analysis, Function and Effects; RCS Publishing, Cambridge, 2012: 396- 416.
- [7] Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK: Antioxidant Potentials of Vitamin A and Carotenoids and Their Relevance to Heart Disease. Free Radical Biology & Medicine 26; 1999: 746–61.
- [8] Livrea MA, Tesoriere L: Antioxidant activity of vitamin A within lipid environments. Subcell Biochem 30; 1998: 113–43.
- [9] Vile GF, Winterbourn CC: Inhibition of adriamycin-promoted microsomal lipid peroxidation by β -caroten, α -tokoferol in retinol at high and low oxygen partial pressures. FEBS Letters 238; 1988: 353-6.
- [10] Conte da Frota ML Jr, Gomes da Silva E, Behr GA, Roberto de Oliveira M, Dal-Pizzol F, Klamt F, Moreira JC: All-*trans* retinoic acid induces free radical generation and modulate antioxidant enzyme activities in rat sertoli cells. Molecular and Cellular Biochemistry 285; 2006: 173–9.
- [11] Pendaries V, Verrecchia F, Michel S, Mauviel A: Retinoic acid receptors interfere with the TGF- β /Smad signaling pathway in a ligand-specific manner. Oncogene 22; 2003: 8212–20.
- [12] Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupé V, Grondona JM, Chambon P: Genetic

evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 124; 1997: 313-26.

- [13] Lu SC: Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine* 30; 2009: 42–59.
- [14] Pridobljeno iz: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminA/rxr.html>, 2. 6. 2014.
- [15] Kenyon Guillory I: The effect of beta-carotene, vitamin E, and vitamin C supplementation upon work capacity during a protocol of arm curl exercise using the biodex dynamometer. Dissertation, Louisiana State University, ProQuest LLC, 2004.
- [16] Pridobljeno iz: <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---T/Alpha-Tocopherol.htm>, 5. 3. 2014.
- [17] Bansal AK, Bansal M, Soni G, Bhatnagar D: Protective role of Vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. *Chemico-Biological Interactions* 156; 2005: Pages 101-11.
- [18] Forman HJ, Zhang H, Rinna A: Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspect of Medicine* 30; 2009: 1–12.
- [19] Yuan L, Kaplowitz N: Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Molecular Aspect of Medicine* 30; 2009: 29–41.
- [20] Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ: Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular Aspect of Medicine* 30; 2009: 86–98.
- [21] Berk M, Johansson S, Wray NR, Williams L, Olsson C, Haavik J, Bjerkeset O: Glutamate cysteine ligase (GCL) and self reported depression: An association study from the HUNT. *Journal of Affective Disorders* 131; 2011: 207–13.
- [22] Huang CS, Chang LS, Anderson ME, Meister A: Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney γ - glutamylcysteine synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 268; 1993: 19675-80.
- [23] Tomic M, Ott J, Barral S, Bovet P, Deppen P, Gheorghita F, Matthey ML, Parnas J, Preisig M, Saraga M, Solida A, Timm S, Wang AG, Werge T, Cuénod M, Do KQ: Schizophrenia and Oxidative Stress: Glutamate Cysteine Ligase Modifier as a Susceptibility Gene. *American Journal of Human Genetics* 79; 2006: 586–92.

- [24] California Biomedical Research Association Fact Sheet: Why Are Animals Necessary in Biomedical Research? Pridobljeno iz: <http://ca-biomed.org/csbr/pdf/fs-whynecessary.pdf>, 10. 4. 2014.
- [25] Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition. Pridobljeno iz: <http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>, 10. 4. 2014.
- [26] Reeves PG: Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. The Journal of Nutrition 127; 1997: 838.
- [27] Pasatiempo AM, Taylor C, Ross C: Vitamin A Status and the Immune Response to Pneumococcal Polysaccharide: Effects of Age and Early Stages of Retinol Deficiency in Rats. The Journal of Nutrition 121; 1990: 556-62.
- [28] Bio-Rad: A Guide to Transfer and Detection, 3. izdaja. Pridobljeno iz http://www.pottslab.org/protocols/Protein%20Biochemistry/protein_transfer_guide.pdf, 10. 4. 2014
- [29] Pridobljeno iz: <http://www.piercenet.com/method/overview-western-blotting>, 10. 4. 2014
- [30] Grmek D: Razvoj HPLC metode za določanje nečistot v zdravilni učinkovini. Diplomsko delo, Maribor, Univerza v Mariboru, FKKT, 2011.
- [31] Pridobljeno iz: http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/cromatografia_alexandre.pdf, 10. 4. 2014.
- [32] Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN, Sunderman FW: Lipoperoxides in Plasma as Measured by Liquid-Chromatographic Separation of Malondialdehyde-Thiobarbituric Acid Adduct. Clinical chemistry 33; 1987: 214-20.
- [33] Rahman Q, Abidi P, Afaq F, Schiffmann D, Mossman BT, Kamp DW, Athar M. : Glutathione redox system in oxidative lung injury. Critical Reviews in Toxicology 29; 1999: 543-68.
- [34] Rodriguez-Estival J, Taggart MA, Mateo R: Alterations in Vitamin A and E Levels in Liver and Testis of Wild Ungulates from a Lead Mining Area. Arch Environ Contam Toxicol 60; 2011: 361–71.
- [35] Alisi CS, Ojiako OA, Osuagwu1 CG, Onyeze GOC: Response Pattern of Antioxidants to Lipid Peroxide Concentration in Carbon Tetrachloride-Induced Hepato-Toxicity Is Tightly Logistic

in Rabbits. *European Journal of Medicinal Plants* 1; 2011: 118-29.

- [36] Balakrishnan R, Sathis Kumar CS, Rani MU, Srikanth MK, Boobalan G, Reddy AG: An evaluation of the protective role of α -tocopherol on free radical induced hepatotoxicity and nephrotoxicity due to chromium in rats. *Indian Journal of Pharmacology* 45; 2013: 490-5.
- [37] Masterjohn C: Regulation of Methylglyoxal Accumulation By Glutathione and Dietary Antioxidants. Dissertation, University of Connecticut, ProQuest LLC, 2012.
- [38] Fang YZ, Yang S, Wu G: Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition* 18; 2002: 872–79.
- [39] Hamre K, Torstensen BE, Maage A, Waagbø R, Berge RK, Albrektsen S: Effects of dietary lipid, vitamins and minerals on total amounts and redox status of glutathione and ubiquinone in tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*): a multivariate approach. *British Journal of Nutrition* 104; 2010: 980–8.
- [40] Reboul E, Thap S, Perrot E, Amiot M-J, Lairon D, Borel P: Effect of the main dietary antioxidants (carotenoids, α -tocopherol, polyphenols, and vitamin C) on α -tocopherol absorption. *European Journal of Clinical Nutrition* 61; 2007: 1167–73.
- [41] Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupé V, Grondona JM, Chambon P: Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 124; 1997: 313-26.
- [42] Esteban-Pretel G, Pilar Marín M, Cabezuelo F, Moreno V, Renau-Piqueras J, Timoneda J, Barber T: Vitamin A Deficiency Increases Protein Catabolism and Induces Urea Cycle Enzymes in Rats. *The Journal of Nutrition* 140; 2010: 792-8.
- [43] Pereda J, Escobar J, Sandoval J, Rodríguez JL, Sabater L, Pallardó RV, Torres L, Franco L, Viña J, López-Rodas G, Sastre J: Glutamate cysteine ligase up-regulation fails in necrotizing pancreatitis. *Free Radical Biology & Medicine* 44; 2008: 1599–609.
- [44] Rahman I, MacNee W: Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 16; 2000: 534-54.
- [45] Jardine H, MacNee W, Donaldson K, Rahman I: Molecular Mechanism of Transforming Growth Factor (TGF)- β 1-induced Glutathione Depletion in Alveolar Epithelial Cells. Involvement of AP-1/ARE and Fra-1. *The Journal Of Biological Chemistry* 277; 2002: 21158–66.

- [46] Lu SC: Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *The FASEB Journal* 13; 1999: 1169-83.
- [47] Poli G: Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine* 21; 2000: 49-98.
- [48] Singh R, Wang Y, Schattenberg JM, Xiang Y, Czaja MJ: Chronic oxidative stress sensitizes hepatocytes to death from 4-hydroxynonenal by JNK/c-Jun overactivation. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 297; 2009: 907-17.
- [49] Czaja MJ: Cell Signaling in Oxidative Stress-Induced Liver Injury. *Semin Liver Dis* 27; 2007: 378-89.

11 PRILOGE

11.1 SESTAVA PUFROV, RAZTOPIN IN GELOV PRI IZOLACIJI IN ANALIZI PROTEINOV

Pufri, geli in raztopine	Sestava
Lizatni pufer I	1 mM EDTA mL 0,1 % SDS mL 20 mM Tris-HCl (pH=) 1 mL 150 mM NaCl mL 1 mM DTT mL 0,1 % Triton X-100 mL

Odpipetiramo sestavine, zmešamo, dodamo 5 µL Protease Inhibitor Cocktail Sigma P-8340

Nanašalni pufer I	1,5 M Tris-HCl (pH=8,8) 2,5 mL 10 % SDS 4,0 mL 50 % glicerol 2,0 mL bromofenol modro M=691,8 g/mol
-------------------	---

Zmešamo reagente, dopolnimo z bidestilirano vodo do 10 mL.

Ločilni gel 18 %	akrilamid/bis-akrilamid (40 %, 38,67, 29:1) 4,5 mL 1,5 M Tris-HCl (pH=8,8) 2,5 mL bidestilirana voda 2,85 mL 10 % SDS 0,1 mL TEMED 5 µL 10 % (w/v) amonijev persulfat 50 µL
------------------	--

Zmešamo reagente, na koncu dodamo amonijev persulfat. Vlijemo med steklci, do vrha dopolnimo z vodo. Počakamo, da se formira gel.

Koncentracijski gel	akrilamid/bis-akrilamid (40 %, 38,67, 29:1) 0,6 mL 0,5 M Tris-HCl (pH=6,8) 1,5 mL bidestilirana voda 3,2 mL 10 % SDS 60 µL 50 % glicerol 0,6 mL TEMED 4 µL 10 % (w/v) amonijev persulfat 30 µL
---------------------	--

Zmešamo reagente, na koncu dodamo amonijev persulfat. Z vrha ločilnega gela odstanimo vodo, med steklci vlijemo raztopino in vstavimo glavničke. Počakamo, da se formira gel.

Elektroforezni pufer	Tris 30,28 g (M= 121,1 g/mol) glicin 144,13 g (M=75,07 g/mol) SDS 10,0 g (M=288,38 g/mol) bidestilirana voda do 1,0 L
----------------------	--

Natehtamo reagente in dopolnimo z vodo do 1,0 L. Pred uporabo razredimo z bidestilirano vodo v razmerju 1:10, do takrat pa hranimo v hladilniku pri 4 °C.

Pufer za prenos proteinov	Tris 3,30 g (M= 121,14 g/mol) glicin 14,40 g (M=75,07 g/mol) bidestilirana voda 600 mL metanol 200 mL ($\geq 99,8\%$)
---------------------------	--

Natehtamo reagenta, raztopimo v vodi, dopolnimo z metanolom.

5 % raztopina mleka	Mleko v prahu (BioRad) 5,0 g TBST do 100 mL
TBST	Tris 12,12 g (M= 121,14 g/mol) 0,15 M NaCl mL 0,05 % Tween 0,5 mL bidestilirana voda mL

Natehtamo reagente, raztopimo v vodi, dodamo Tween.

Kromogen substrat I	3,3'-diaminobenicidin $C_{12}H_{14}N_4 \cdot 4\ HCl$ (M=360,12 g/mol) 10 mg 50 mM fosfatni pufer (pH=7,4) 20 mL 0,6 mL kovinske raztopine (1 % $CoCl_2$, 1 % $(NH_4)NiSO_4$, nikelj)
---------------------	--

Natehtamo reagent, ga raztopimo v pufru in med mešanjem po kapljicah dodajamo kovinsko raztopino.

Kromogen substrat II	10 mL kromogenega substrata I 1 μL H_2O_2 (31,3 %)
----------------------	--

Kromogenemu substratu I dodamo raztopino vodikovega peroksida, mešamo.

11.2 SESTAVA PUFROV IN RAZTOPIN PRI HPLC

Pufri in raztopine	Sestava
Lizatni pufer II	50 mM Tris-HCl (pH=7,5) 1 mL 0,1 % triton X-100

Odpipetiramo sestavine, zmešamo, dodamo 5 μL Protease Inhibitor Cocktail Sigma P-8340

Nanašalni pufer II	0,44 M ortofosforna kislina 750 μL 6 mg/mL TBA 250 μL bidestilirana voda 450 μL
--------------------	--

Odpepitiramo reagente, stresamo raztopino.

Nevtralizacijska zmes	Metanol 4,5 mL ($\geq 99,8\%$)
-----------------------	----------------------------------

Mobilna faza	3 M NaOH 0,5 mL 50 mM fosfatni pufer (pH=6,8) 830 mL acetonitril 170 mL (99,8 %)
--------------	--