

MAGDALENA MILEWSKA¹, BEATA SIŃSKA¹, JOANNA GROMADZKA – OSTROWSKA²

DIETY HIPERCHOLESTEROLEMICZNE ZAWIERAJĄCE RÓŻNE TŁUSZCZE SPOŻYWCZE A LIPIDOGRAFIĘ OSOCZA SZCZURÓW

HYPERCHOLESTEROLEMIC DIETS CONTAINING DIFFERENT COMMON FATS AND RATS PLASMA LIPIDS

¹Zakład Żywienia Człowieka
Akademia Medyczna
01-445 Warszawa, ul. Ciołka 27
e-mail: magdalena.milewska@op.pl
Kierownik: prof. dr hab. B. Szczygieł

²Katedra Dietetyki
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
02-778 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159C
Kierownik: prof. dr hab. J. Gromadzka-Ostrowska

Celem badań było określenie wpływu wysokotłuszczowych (20% w/w), hipercholesterolemicznych (3% w/w) diet zawierających różne tłuszcze spożywcze (margaryna ze sterolami roślinnymi, margaryna na bazie oleju rzepakowego, masło i olej słonecznikowy) na stężenie cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL i triacylogliceroli w osoczu szczurów. Dodatek cholesterolu do wszystkich rodzajów badanych tłuszczów spożywczych, z wyjątkiem margaryny zawierającej sterole roślinne, miał działanie hipercholesterolemiczne.

Słowa kluczowe: fitosterole, kwasy tłuszczowe, lipidy osocza, tłuszcz diety, szczury
Key words: dietary fat, fatty acids, phytosterols, plasma lipids, rats

WSTĘP

Główną przyczyną zgonów w większości krajów europejskich, także i w Polsce, są nadal choroby rozwijające się na tle miażdżycy. Zaburzenia metabolizmu cholesterolu i lipoprotein zajmują kluczowe miejsce w patofizjologii miażdżycy i choroby wieńcowej. Dieta źle skomponowana pod względem składu kwasów tłuszczowych oraz ilości cholesterolu wpływa na podwyższenie parametrów lipidowych niekorzystnych z punktu widzenia profilaktyki chorób układu sercowo-naczyniowego.

Celem pracy było zbadanie w układzie modelowym wpływu dodatku 3% cholesterolu do różnego rodzaju tłuszczów na stężenia cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL i triacylogliceroli w osoczu szczurów karmionych dietami, w których głównym źródłem tłuszczu

była margaryna ze sterolami roślinnymi, margaryna na bazie oleju rzepakowego, masło i olej słonecznikowy.

MATERIAŁ I METODY

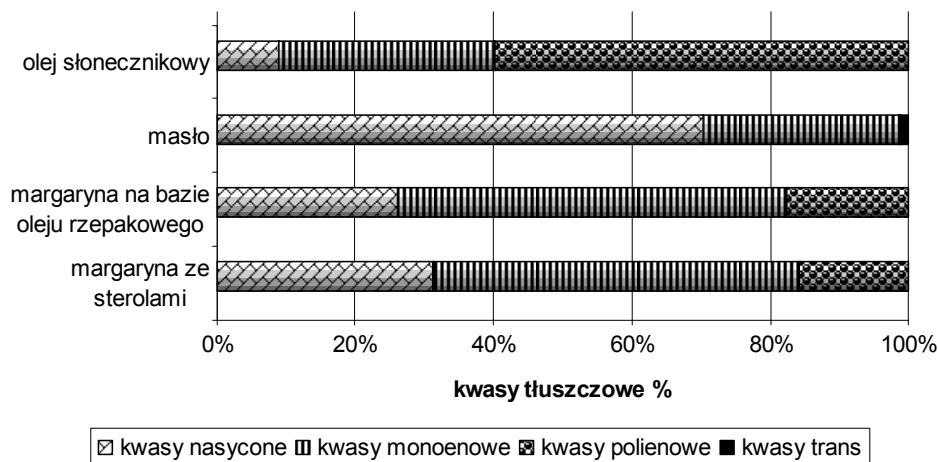
Badania przeprowadzono (zgodą III Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie) na młodych szczurach, samcach rasy *Wistar* o początkowym ciężarze ciała 180-200g, trzymanych w standardowych warunkach (temp. 20°C, dwunastogodzinny cykl świetlny, wilgotność powietrza 50 – 65%) ze stałym dostępem do pożywienia i wody. Po tygodniowym okresie adaptacyjnym zwierzęta podzielono na 4 grupy, różniące się rodzajem tłuszczu zawartego w pożywieniu (margaryna ze sterolami roślinnymi – grupa B, masło – grupa M, margaryna na bazie oleju rzepakowego – grupa R i olej słonecznikowy – grupa S). Wszystkie diety zawierały wagowo 20% tłuszczu. Każdą z 4 grup podzielono na dwie podgrupy po 7 zwierząt każda: 1 – karmiona dieta wysokotłuszczową bez dodatku cholesterolu i 2 – z dodatkiem 3% (w/w) cholesterolu w celu wywołania hipercholesterolemii. Przez cały czas trwania doświadczenia prowadzono kontrolę spożycia i przyrostu masy ciała.

Po 6 tygodniach karmienia dietami doświadczalnymi w narkozie barbituranowej (Thiopental 120 mg/kg masy ciała dootrzewnowo) pobrano krew z lewej komory serca. W osoczu krwi oznaczono stężenie cholesterolu całkowitego (TC), cholesterolu frakcji HDL (HDL) i triacylogliceroli (TG) z użyciem testów enzymatycznych firmy BioMerieux. Metodą chromatografii gazowej według *Daniewskiego* i wsp. (1998) oznaczono skład kwasów tłuszczowych w tłuszczach diet.

Wyniki opracowano za pomocą programu STATGRAPHICS (wersja 4.1) z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a.

WYNIKI

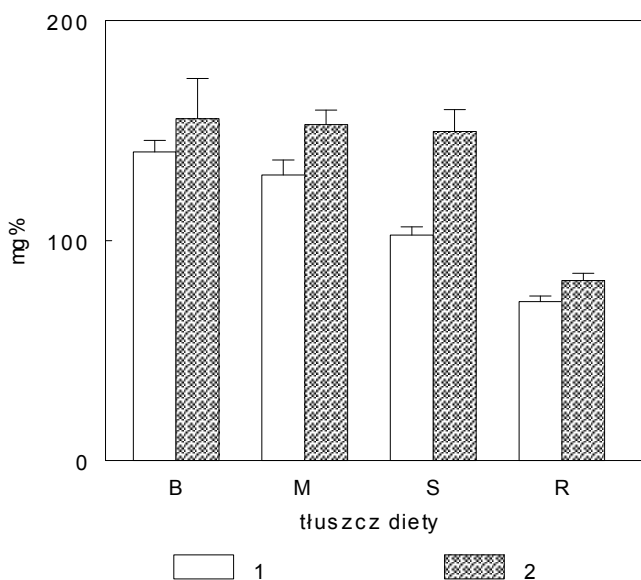
Skład kwasów tłuszczowych poszczególnych tłuszczów użytych w doświadczeniu ilustruje Ryc. 1.



Ryc. 1 Skład kwasów tłuszczowych w produktach tłuszczowych użytych w doświadczeniu
Dietary fatty acids content in experimental used fats

Analiza wariancji nie wykazała istotnego statystycznie wpływu zarówno rodzaju tłuszczu, jak i dodatku 3% cholesterolu na dobowe całkowite spożycie diety i spożycie tłuszczu. Również wskaźnik wydajności wzrostowej diety nie był różnicowany ani przez rodzaj tłuszczu w niej zawartego ani przez dodatek 3% cholesterolu. Przyrosty masy ciała ze wszystkich 8 grup doświadczalnych także nie różniły się istotnie.

Stwierdzono natomiast istotny statystycznie wpływ zarówno rodzaju tłuszczu (ANOVA, $p \leq 0,00001$), jak i dodatku cholesterolu (ANOVA, $p \leq 0,02$) na stężenia cholesterolu całkowitego w osoczu. U zwierząt karmionych dietami bez dodatku cholesterolu najwyższe wartości TC stwierdzono w grupie B1 i M1, najniższe – w grupie R1. Dodatek 3% cholesterolu we wszystkich grupach dietetycznych wywołał efekt hipercholesterolemiczny, nieistotny jedynie w grupie B2, a największy w grupie S2 (Ryc. 2).



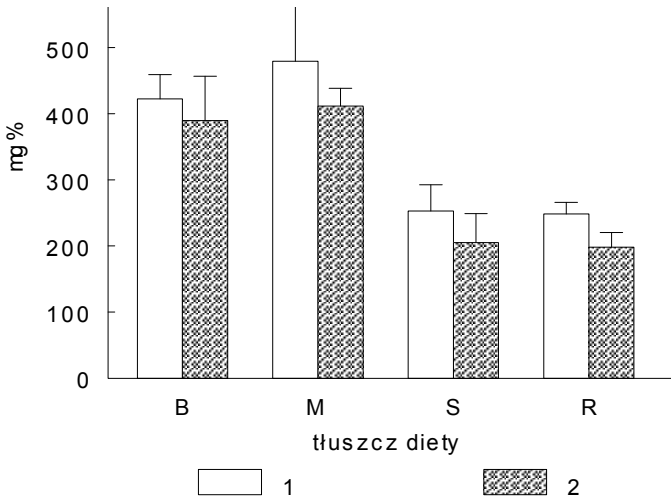
1 – diety wysokotłuszczowe bez dodatków, 2 – diety wysokotłuszczowe z dodatkiem 3% cholesterolu
 B – margaryna ze sterolami roślinnymi, M – masło, S – olej słonecznikowy, R – margaryna na bazie oleju rzepakowego

1 – high-fat diets without supplementation, 2 – high-fat diets with cholesterol (3% w/w) supplementation

B – margarine with phytosterols, M – butter, S – sunflower oil R – margarine with rapeseed oil

Ryc. 2. Stężenie cholesterolu całkowitego w osoczu szczurów (średnia \pm SD)
 Total cholesterol plasma level (mean \pm SD)

Na stężenie triacylogliceroli istotny statystycznie wpływ miał tylko rodzaj tłuszczu diety (ANOVA, $p \leq 0,00001$). We wszystkich grupach dietetycznych dodatek cholesterolu nie zmienił istotnie poziomu tego parametru. Analizując grupy zwierząt karmionych dietami bez dodatku cholesterolu najwyższe wartości TG stwierdzono w grupie B1 i M1, najniższe – w grupie S1 i R1 (Ryc. 3).



Objaśnienia jak do Ryc. 2
Legends as for Fig. 2

Ryc. 3 Stężenie triacylogliceroli w osoczu szczurów (średnia \pm SD)
Triacylglycerols plasma level (mean \pm SD)

Stężenie cholesterolu frakcji HDL nie zależało istotnie ani od rodzaju tłuszczu ani od dodatku cholesterolu (ANOVA w obu przypadkach NS).

DYSKUSJA

Badania modelowe stanowiące przedmiot niniejszej pracy miały na celu określenie wpływu rodzaju tłuszczu diety i dodatku do niej 3% cholesterolu na stężenia cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji HDL oraz triacylogliceroli. W dietach zastosowano 4 rodzaje tłuszczów spożywczych, różniące się pod względem pochodzenia i składu kwasów tłuszczowych: margarynę ze sterolami roślinnymi, margarynę na bazie oleju rzepakowego, masło i olej słonecznikowy. Diety eksperymentalne zawierały wagowo 20% tłuszczu, modyfikacja ta była niezbędna ze względu na oporność tych zwierząt na indukowanie zmian miażdżycowych drogą pokarmową. U szczurów bowiem większość cholesterolu przenoszona jest przez frakcję HDL-i, co może odpowiadać za oporność tych zwierząt na hiperlipidemię [1, 2], a dodatek 3% cholesterolu do pożywienia szczurów konieczny był do wywołania w nich hipercholesterolemii [2].

Skład diet i ich spożycie nie wpłynęło na tempo przyrostu masy ciała zwierząt i ich ciężary końcowe. Stwierdzono, że zwierzęta w poszczególnych grupach dietetycznych wykazywały podobne tempo przyrostu masy ciała, a ich średnie ciężary nie różniły się między sobą w sposób istotny, zatem zwierzęta rosły jednakowo.

Niniejsze badanie wykazało istotny wpływ zarówno rodzaju tłuszczu, jak i dodatku cholesterolu na stężenie cholesterolu całkowitego w osoczu, przy czym największy wzrost po-

ziomu tego lipidu stwierdzono w osoczu zwierząt karmionych dietą hipercholesterolemiczną z masłem lub olejem słonecznikowym. W przypadku masła odpowiedzialna za to jest zarówno naturalna zawartość w nim cholesterolu, jak i wysoka zawartość kwasu palmitynowego, który podnosi stężenie cholesterolu całkowitego tylko wówczas, gdy jest składnikiem diety bogatej w cholesterol [2]. Także w badaniach *During'a* i wsp. [6], którzy podawali szczurom tłuszcz mleczny, stwierdzono podwyższenie stężenia cholesterolu całkowitego. Również badanie *Feoli* i wsp. [7] potwierdziło wpływ oleju kokosowego, bogatego w nasycone kwasy tłuszczowe, zawartego w diecie hipercholesterolemicznej na podwyższenie stężenia cholesterolu całkowitego w osoczu krwi szczurów. Jak wykazały badania własne wielonienasycone kwasy z rodziny n-6 zawarte w oleju słonecznikowym nie obniżają stężenia cholesterolu całkowitego. Można zatem przypuszczać, że wpływają one zarówno na wolniejsze wychwytywanie cholesterolu egzogenne przez wątrobę, jak i zmniejszone wydzielanie tego lipidu z kwasami żółciowymi. Przypuszczenia te przeciwstawiają się sugestiom *Garg'a* [8], który sądził, że u szczurów kwasy n-6 wpływają na produkcję metioniny, choliny i kobalaminy – związków, które wspomagają akumulację cholesterolu w wątrobie. Jednakże *Bravo* i wsp. [4] wykazali, że u szczurów to kwasy nasycone wpływają na wolniejsze usuwanie cholesterolu pochodzenia pokarmowego z organizmu.

W badaniu własnym w grupie zwierząt karmionych dietą z margaryną ze sterolami roślinnymi po dodaniu cholesterolu nie zaobserwowano istotnego statystycznie podwyższenia cholesterolu całkowitego w osoczu, co dowodzi hipocholesterolemicznego działania steroli i stanoli roślinnych zawartych w tym tłuszczu spożywczym. Wnioski te potwierdziły badania *During'a* i wsp. [6], którzy podawali szczurom dwa rodzaje diet: dietę zawierającą tłuszcz mleczny oraz dietę zawierającą tłuszcz mleczny, olej słonecznikowy i olej sojowy jako źródła fitosteroli. Okazało się, że częściowe zastąpienie tłuszczu mlecznego przez oleje roślinne zawierające fitosterole powoduje zwiększenie wydalania cholesterolu endogenne oraz obojętnych steroli z kałem. Wyniki badań *Batta* i wsp. [3] przeprowadzone również na szczurach potwierdziły znaczenie steroli roślinnych, a w szczególności stigmasterolu, w obniżaniu stężenia cholesterolu całkowitego w osoczu, prawdopodobnie przez zmniejszoną jego absorpcję ze światła jelita i/lub zwiększoną syntezę kwasów żółciowych.

W badaniu własnym stwierdzono istotny wpływ tylko rodzaju tłuszczu pokarmowego na stężenie triacylogliceroli, z wyższymi poziomami tych lipidów u zwierząt karmionych dietą zawierającą margarynę ze sterolami roślinnymi lub masłem. Zatem sterole roślinne nie wykazały działania obniżającego stężenie triacylogliceroli. Niestety brak jest badań przeprowadzonych na szczurach nad wpływem fitosteroli na poziom triacylogliceroli w osoczu. Można jedynie przypuszczać, że w przypadku grupy zwierząt karmionych dietą zawierającą masło za wyższe stężenie TG mogą być odpowiedzialne nasycone kwasy tłuszczowe, przeważające w tym produkcie. Takie przypuszczenie potwierdzają wyniki badań *Feoli* i wsp. [7], w których stwierdzono, że dieta, w której głównym źródłem tłuszczu był olej kokosowy, bogaty w nasycone kwasy tłuszczowe, powoduje podwyższenie stężenia triacylogliceroli, a zarówno olej kukurydziany, jak i bawełniany nie zmieniają istotnie poziomu tego parametru [9]. Z drugiej strony *Aguila* i wsp. [1] stwierdzili, że również olej sojowy podwyższa stężenie triacylogliceroli u szczurów.

W naszym badaniu dodatek cholesterolu spowodował niewielkie obniżenie stężenia triacylogliceroli we wszystkich grupach dietetycznych. Tendencje te jednak skłaniają do przypuszczeń, że zarówno fitosterole, jak i wielonienasycone kwasy tłuszczowe mogą wykazy-

wać działanie obniżające stężenie TG dopiero przy stosowaniu diet hipercholesterolemicznych. W przypadku masła odpowiedzialne za to zjawisko mogą być sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA), co było obserwowane także w badaniach Sebedio i wsp. [10], którzy w swoim doświadczeniu karmili szczury mieszaniną izomerów CLA i stwierdzili redukcję stężenia triacylogliceroli. Autorzy tego badania sugerowali, że odpowiedzialny za to zjawisko może być izomer CLA trans-10, cis 12, który przyczynia się do zwiększenia ilości wolnych kwasów tłuszczowych w lipidach wątroby.

WNIOSKI

1. W badaniu modelowym na szczurach można uzyskać efekt hipercholesterolemiczny stosując wzbogaconą cholesterolem wysokotłuszczową dietę, zawierającą różne tłuszcze spożywcze
2. Stanole i sterole roślinne, zawarte w wzbogaconej w nie margarynie, mogą obniżyć poziom cholesterolu całkowitego w osoczu krwi szczurów

M. Milewska, B. Sińska i J. Gromadzka-Ostrowska

DIETY HIPERCHOLESTEROLEMICZNE ZAWIERAJĄCE RÓŻNE TŁUSZCZE SPOŻYWCZE A LIPIDOGRAM OSOCZA SZCZURÓW

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu wysokotłuszczowej (20% w/w) hipercholesterolemicznej (3% w/w) diety zawierającej różne tłuszcze spożywcze (margaryna ze sterolami roślinnymi, margaryna na bazie oleju rzepakowego, masło i olej słonecznikowy) na stężenie cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL i triacylogliceroli w osoczu. Badania przeprowadzono na szczurach *Wistar* karmionych przez 6 tygodni dietami doświadczalnymi. Poziom lipidów osocza oznaczano stosując testy enzymatyczne.

Dodatek cholesterolu do wszystkich rodzajów badanych tłuszczów spożywczych, z wyjątkiem margaryny zawierającej sterole roślinne, miał działanie hipercholesterolemiczne, co może świadczyć o hipercholesterolemicznym działaniu fitosteroli u szczurów.

M. Milewska, B. Sińska, J. Gromadzka-Ostrowska

HYPERCHOLESTEROLEMIC DIETS CONTAINING DIFFERENT COMMON FATS AND RATS PLASMA LIPIDS

Summary

The aim of the study was evaluated high-fat (20% w/w), hypercholesterolemic (3% w/w) diets differing in dietary fat type (butter, margarine with stanols, margarine with rapeseed oil and sunflower oil) influence on plasma lipids profile in male *Wistar* rats.

The results show that cholesterol enriched diets, excluding diet containing margarine with stanols, had hypercholesterolemic effects on rats.

Praca wykonana w ramach grantu KBN nr badań statutowych nr 3P06T 02624

PIŚMIENNICTWO

1. *Aguila M.B., Loureiro C.C., Pinheiro Ada R., Mandarim-De-Lacerda C.A.*: Lipid metabolism in rats fed diets containing different types of lipids. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2002, 78, 25-38.
2. *Bartnikowska E., Michajlik A.*: Lipidy i lipoproteiny osocza, 1999, PZWL Warszawa.
3. *Batta A.K., Xu G., Monda A., Miyazaki T., Salen G.*: Stogmasterol reduces plasma cholesterol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rats. *Metabolism*, 2006, 55, 292 – 299.
4. *Bravo E., Flora L., Cantafora A., De Luca V., Tripodi M., Avella M., Mayes P.A., Botham K.M.*: Comparison of uptake and processing of cholesterol from chylomicrons of different fatty acid composition in rats fed high-fat and low-fat diets. *Eur. J. Bioch.*, 1997, 246, 92-102
5. *Daniewski M., Mielniczuk E., Jacórzyński B.*: Oszacowanie dziennego spożycia kwasów tłuszczowych w przeciętnej racji pokarmowej. *Żyw. Człow. Metab.*, 1999, 26, 13-18.
6. *During A., Combe N., Mazette S., Entressangles B.*: Effects on cholesterol balance and LDL cholesterol in the rat of a soft-ripened cheese containing vegetable oils. *J. Am. Coll. Nutr.*, 2000, 19, 458-466.
7. *Feoli A.M., Roehrig C., Rotta L.N., Kruger A.H., Souza K.B., Kessler A.M., Renz S.V., Brusque A.M., Souza D.O., Perry M.L.*: Serum and liver lipids in rats and chicks fed with diets containing different oils. *Nutr.*, 2003, 19, 789 – 793.
8. *Garg M.L.*: Metabolic fate of dietary cholesterol in presence of canola oil or sunflower oil. *University of Newcastle*, 2001, Symposium Abstracts.
9. *Radcliffe J.D., Czajka-Narins D.M.*: Lipids and tocopherols in serum and liver of female rats fed diets containing corn oil and cottonseed oil. *Plant Foods Human Nutrition*, 2006, 61, 33 – 36.
10. *Sebedio J.L., Angioni E., Chardigny J.M., Gregoire S., Juaneda P., Berdeaux O.*: The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acid profiles of liver and adipose tissues and their conversion to isomers of 16:2 and 18:3 conjugated fatty acids in rats. *Lipids*, 2001, 36, 575-582.