

EFEKTI ATEROGENE DIJETE NA LIPIDNI STATUS I NEKE ANTIOKSIDACIONE VARIJABLE U KRVI PACOVA

Saško D. Velkovski¹, Verica Milošević², Snežana Ristić¹,
Slađan Paulović², Zorica S. Saičić², Vesna P. Starčević¹

¹Institut za fiziologiju, Medicinski fakultet u Beogradu, Višegradska 26/II, 11001 Beograd

²Institut za biološka istraživanja »Siniša Stanković«, 29. Novembra 142, 11060 Beograd

Kratak sadržaj: U ovom radu je praćen efekat osmonedeljne modifikovane dijetete za pacove na lipidni status, aktivnost glutation-S-transferaze, katalaze, glutationa i koncentracije vitamina E u plazmi mužjaka Wistar pacova. Životinje su žrtvovane bez anestezije, dekapitacijom, 24 h po prestanku dijetete. Krv je prikupljena u heparizovane epruvete radi određivanja komponenata lipidnog statusa: triglicerida, HDL i LDL. Za histološku analizu je izolovana abdominalna aorta. Koncentracije vitamina E, triglicerida, ukupnog i LDL holesterola u plazmi i odnos LDL/HDL, su bile značajno povećane ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolom. Aktivnost glutation-S-transferaze, katalaze i koncentracije glutationa takođe su povećani u odnosu na kontrolne pacove, ali ne pokazuju statističku značajnost ($p > 0,05$). Dobijeni rezultati pokazuju da prolongirana specifična aterogena dijeta kod pacova dovodi do značajnog povećanja varijabli lipidnog statusa bez sličnih promena u antioksidativnom statusu u krvi.

Ključne reči: ateroskleroza, pacovi, lipidni status, antioksidacioni status.

Uvod

Kardiovaskularna oboljenja su jedan od glavnih zdravstvenih problema, s obzirom na to da doprinose 50% mortalitetu od ukupnog broja evidentiranog, odnosno oko jedne trećine umrlih su u starosnoj grupi između 35 i 65 godina. Koronarna srčana oboljenja a u manjoj meri cerebrovaskularna oboljenja su glavni uzročnici kardiovaskularnog mortaliteta (1).

Ateroskleroza je bolest velikih elastičnih i velikih mišićnih arterija koja se manifestuje mestimičnim oštećenjem intime (2), odnosno ona je hronično inflamatorno stanje vaskularnog zida, koje prelazi u akutno kliničko stanje zbog rupture plaka, što uslovljava nastanak tromboze (3).

Na pojavu i razvoj ateroskleroze utiču brojni faktori rizika: životno doba, pol, porodična predispozicija, urođeni poremećaji metabolizma, hiperlipidemija, ar-

terijska hipertenzija, pušenje, fizička neaktivnost, gojaznost.

Hiperholesterolemija (stečena ili hiperlipoproteinemija tip IIa), povećanje koncentracije triglicerida i lipoproteina, su najvažniji i najviše ispitivani faktori rizika (4). Lipoproteini male gustine (LDL) ulaze u ćeliju vezujući se za LDL-receptore preko apoproteina B. Ako je koncentracija LDL u plazmi povećana, višak LDL koji ostaje u cirkulaciji podleže oksidaciji koja podstiče aterogenezu. Drugi važan lipoprotein u metabolizmu holesterola je lipoprotein velike gustine (HDL). HDL je supstrat lecitin-holesterol-acil-transferaze (LCAT), koja esterifikuje slobodni holesterol i smanjuje njegovu koncentraciju u plazmi (5).

Važnu ulogu u usporavanju procesa ateroskleroze ima endogeni antioksidacioni zaštitni sistem koji čine enzimi: superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutationperoksidaza (GSH-Px), glutation-S-transferaza (GST), glutation-reduktaza (GR) i neenzimske komponente: glutation (GSH), vitamin E, vitamin C, ubihinon (Co Q) i druge. U stručnoj terminologiji postoji više naziva za ovaj sistem, ali se termin »antioksidacioni zaštitni sistem« (AOS) ustalio krajem osamdesetih i početkom devedesetih godina dvadesetog veka (6, 7).

Adresa autora

Dr Saško Velkovski
Institut za fiziologiju
Medicinski fakultet
Višegradska 26/II
11001 Beograd

Cilj ovog rada je bio da se, na animalnom modelu eksperimentalne ateroskleroze, utvrdi povezanost povećane koncentracije lipida i promena u AOS u krvi.

Materijal i metode

U ovom radu korišćeni su odrasli mužjaci Wistar albino pacova, telesne mase oko 400 g podeljeni u dve grupe po pet životinja: kontrolnu (K) i eksperimentalnu (E). Sve životinje su držane na sobnoj temperaturi 22 ± 2 °C u kojoj je poštovan svetlosni režim dan/noć (12h:12h). Životinje su dobijale vodu i peletiranu hranu *ad libitum*.

Tretman životinja

Eksperimentalne životinje su podvrgnute modifikovanoj aterogenoj dijeti za pacove u trajanju od osam nedelja (8). Aterogena smesa je sadržala: 40% butera, 10% suncokretovog ulja, 5% kristalnog holesterola, 17% saharoze, 20% kazeina, 4% NaCl, 2% holne kiseline, 0,3% tiouracila, 1% holinhlorida, 0,5% MgO i 0,2% inozitola. Svaka eksperimentalna životinja je dobijala po 5 g aterogene smese svakog jutra sondom, intragastrično, u toku 8 nedelja. Po završetku tretmana, životinje su žrtvovane dekapitacijom, bez anestezije, između 8 i 10 h pre podne. Uzetoj krvi određivani su lipidni i antioksidacioni status.

Biohemijske analize

Krv je sakupljana u heparinizovane epruvete, centrifugirana 15 minuta s 5 000 rpm da bi se odvojili eritrociti i plazma. Koncentracije komponenata lipidnog statusa (triglicerida, ukupnog holesterola, HDL holesterola i LDL holesterola) određivane su u uzorku heparinizirane plazme, primenom uobičajenih enzimskih kolorimetrijskih testova (Zastava Yugomedica, Kragujevac u saradnji sa Lightning Instrumentation, Lausanne, Switzerland). Takođe je računat odnos

koncentracija LDL/HDL. U plazmi su određivane aktivnost glutation-S-transferaze (GST) (9), koncentracija vitamina E (Vit. E) (10) i glutationa (GSH) (11).

Posle odvajanja plazme eritrociti su ispirani tri puta sa po 2 mL fiziološkog rastvora i centrifugirani tri puta po 10 minuta na 5 000 rpm. Opranim eritrocitima je dodavana hladna destilovana voda u odnosu 1:3, a zatim su uzorci ostavljani da liziraju na ledu (0 °C) uz povremeno mućkanje. U hemolizatu je određivana aktivnost enzima katalaze (12).

Histološke analize

Za histološku analizu je izolovana abdominalna aorta koja je fiksirana u Buenovom (Bouin) fiksativu. Dehidracija je obavljena u seriji rastvora alkohola (30%, 50%, 70%, 96% i 100%), prosvetljavanje u ksilolu, a kalupljenje u parafinu. Preseci debljine 5 mm bojeni su hematoksilin-eozinom i analizirani na svetlosnom mikroskopu Opton.

Statistička obrada podataka

Za testiranje značajnosti razlika korišćen je neparametarski dvosmerni Mann-Whitney U test iz softverskog paketa statističkih testova Pharmacologic Calculation System (R. J. Tallarida & R. B. Murray, Springer Verlag, New York, 1986).

Rezultati

Koncentracije triglicerida, ukupnog holesterola i LDL holesterola u plazmi eksperimentalne grupe bile su statistički značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$). Koncentracija HDL holesterola u eksperimentalnoj grupi se nije razlikovala u odnosu na kontrolnu grupu ($p > 0,05$). Odnos LDL/HDL u grupi E bio je statistički značajno veći ($p < 0,01$) u poređenju sa kontrolom (Tabela I).

Tabela I Lipidni status mužjaka pacova posle osmonedeljne dijetе

Grupe	TG, mmol/L	H, mmol/L	HDL, mmol/L	LDL, mmol/L	LDL/HDL
K	0,98 0,29	2,02 0,34	0,90 0,26	0,67 0,25	0,82 0,47
E	1,12 0,8* (+14%)	3,53 1,77** (+75%)	0,85 0,46 (6%)	2,31 1,83** (+245%)	3,61 2,81** (+340%)

(\bar{x} SD; n=5); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabela II Antioksidacione varijable u krvi mužjaka pacova posle osmonedeljne dijetе

Grupe	CAT, U/mL	GST, U/mL	GSH, mmol/L	Vit. E, mg/L
K	39,60 26,90	70,23 32,32	2452 895	5,12 0,75
E	55,34 29,26 (+10%)	78,40 32,32 (+2%)	2972 277,4 (+21%)	12,16 4,31* (+138)

(\bar{x} SD; n=5); * $p < 0,01$.

Aktivnost GST i koncentracija GSH u plazmi eksperimentalne grupe bile su veće za 12% odnosno 21% u odnosu na kontrolnu grupu, ali ne statistički značajno ($p > 0,05$) (Tabela II). Koncentracija Vit. E u eksperimentalnoj grupi je bila statistički značajno veća ($p < 0,01$) za 138% u poređenju sa kontrolom. Aktivnost CAT u eritrocitima pacova eksperimentalne grupe je bila povećana za 40% u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statističke značajnosti ($p > 0,05$) (Tabela II).

Zid abdominalne aorte kontrolnih životinja je imao tipičnu građu zida arterije elastičnog tipa: endotel, dobro razvijenu intimu u čijem su se subendotelnom matriksu nalazile sporadične glatke mišićne ćelije sekretornog tipa, mediju od više slojeva glatkih mišićnih ćelija kontraktilnog tipa odvojenih fenestriranim elastičnim laminama, i tanku adventiciju. Kod eksperimentalnih životinja, zid abdominalne aorte je bio zadebljan u celini. Na endotelu su se mogla primetiti mestimična oštećenja. Intima je bila mestimično umereno zadebljana sa retkom fokalnom ćelijskom akumulacijom. Slojevi medije su bili odvojeni elastičnim laminama čija je struktura mestimično bila nejasna, a mestimično su se zapažale akumulacije lipida. Broj glatkih mišićnih ćelija sintetskog fenotipa je bio povećan. Adventicija je bila umereno zadebljana, bez znakova zapaljenja.

Diskusija

Rezultati prikazani u ovom radu pokazuju da su koncentracije triglicerida, ukupnog holesterola i LDL holesterola u eksperimentalnoj grupi povećani u odnosu na kontrolu. Slične promene su uočene i na drugim animalnim modelima ateroskleroze (13). Ako se posmatra ukupni lipidni status, odnosno sve njegove komponente zajedno, uočava se da izrazito povećanje koncentracije ukupnog holesterola u toku ateroskleroze nastaje zbog povećanja koncentracije LDL holesterola. Povećana koncentracija LDL praćena je njihovom oksidacijom, a za oksidovani LDL (oxLDL) receptori glatkih mišićnih ćelija i monocita imaju veći afinitet i nastaje njihova ekstenzivnija internalizacija (14). U ranijim radovima je pokazano da apsolutni nedostatak ili defekt LDL-receptora (hiperlipoproteinemija tip II), kao i njihov relativni nedostatak (alimentarna hiperlipoproteinemija tip IIa) ima za posledicu povećanje koncentracije LDL u plazmi i povećanje odnosa koncentracija LDL i HDL u plazmi. U kontaktu sa endotelom LDL se oksiduje i acetiluje (15). Kroz oštećenu endotelnu barijeru LDL lako prodiere u intimu gde se fagocituju tkivni makrofagi (16). Utvrđeno je da su makrofagi i glatke mišićne ćelije ispunjene lipidima penaste ćelije (17). Penaste ćelije, koje mi nismo zapazili histološkom analizom abdominalne aorte pacova, u ateroskleroznom plaku, nastaju i zbog ćelijskog preuzimanja ostataka hilomikrona. Arterijska akumulacija ostataka hilomikrona može doprineti destabilizaciji plaka kao posledici ćelijske smrti

nakon produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) u makrofagima i glatkim mišićnim ćelijama (18). U oksidaciji LDL važnu ulogu ima superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet -}$) u endotelnim ćelijama (19). Povećano oslobađanje $O_2^{\bullet -}$ iz zidova arterija u hiperholesterolemiji potvrđuju koncept da je arterijski zid u hiperholesterolemiji i/ili aterosklerozi pod povećanim oksidacionim stresom (20). Superoksid anjon radikal i azot oksid (NO^{\bullet}) produkovani u zidovima arterija od strane endotelnih i glatkih mišićnih ćelija formiraju peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$), a ovaj razlaganjem daje visoko reaktivni hidroksil radikal koji oksiduje LDL. Na taj način, oba ova radikala doprinose patogenezi ateroskleroze (21). LDL mogu direktno da stimulišu proliferaciju glatkih mišićnih ćelija, povećanjem aktivnosti protein kinaze C (PKC) (22).

Sve veći broj dokaza potvrđuje da su brojna patofiziološka stanja udružena sa povećanom vaskulnom produkcijom ROS (23). Proaterogenim efektima ROS suprotstavlja se endogeni antioksidacioni zaštitni sistem. Jedan od mehanizama zaštite AOS je inhibicija aterogenih efekata LDL delovanjem SOD (24). Adheziju leukocita za endotel u ranoj aterogenezi stimulišu oksidovani LDL. Ova stimulacija adhezije leukocita za endotel oksidovanim LDL odvija se preko $O_2^{\bullet -}$ zavisnog puta i inibira je SOD koja sadrži bakar i cink (CuZn SOD) (25). Preživljavanje makrofaga i glatkih mišićnih ćelija obrnuto je srazmerno produkciji ROS, a znatno se produžava u prisustvu SOD i CAT (18). Monociti i makrofage sadrže više GSH posle izlaganja oksidovanim LDL, što je posledica *de novo* sinteze stimulisane oksidovanim LDL (26). Ateromatozni plakovi su bogati ćelijama koje sadrže GSH-Px, dok ćelije normalnih arterijskih zidova skoro da i ne sadrže GSH-Px. Aktivnost GSH-Px u ćelijama ateromatoznog plaka se povećava tek pošto se lipidna peroksidacija dogodila (27). Ravnoteža između oksidacije LDL i posledičnog stvaranja ROS, s jedne i aktivnosti komponenta AOS, s druge strane, određuje da li će se i u kojoj meri odvijati aterogeneza.

U ovom eksperimentalnom modelu aktivnost CAT u eritrocitima nije značajno promenjena, što je u skladu sa nalazima drugih autora (28). Osim toga, aktivnost CAT se ne menja značajno ni u humanim vaskularnim oboljenjima s aterosklerotičnom osnovom, kao što je angina pectoris (29). Naši rezultati pokazuju da aktivnost GST u plazmi nije bila statistički značajno povećana, ali treba imati u vidu da je u ranijim radovima pokazano da se GST nalazi pretežno u citosolu a kod pacova u mikrozomima, endoplazmatičnom retikulumu i spoljašnjoj membrani mitohondrija (30). Druga istraživanja na ovakvim eksperimentalnim modelima pokazuju da je u plazmi smanjena aktivnost antioksidacionih zaštitnih enzima, dok u eritrocitima ostaje normalna aktivnost CAT (31). Činjenica da ni koncentracija GSH u plazmi nije statistički značajno promenjena ukazuje da se, u ovom eksperimentalnom modelu, glutation redoks sistem u celini ne menja. Od posmatranih antioksidacionih varijabli,

jedino je koncentracija Vit. E u plazmi bila statistički značajno veća u eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolu. Istraživanja humanog antioksidacionog statusa, takođe daju podatke da je koncentracija Vit. E povećana u bolestima koje su posledica hiperlipoproteinemije ili koegzistiraju sa njom (29). Literatura obiluje često vrlo oprečnim podacima o efektima hiperlipidemije, aterogeneze, ateromatoze i ateroskleroze na AOS i njegove pojedine komponente. Te promene se razlikuju ne samo između različitih vrsta (32), već i između različitih tkiva (33). Većina istraživača se slažu

u tome da je interakcija između komponenata AOS veoma složena i različita u zavisnosti od oksidacionog agensa. Dobijeni rezultati pokazuju da produžena specifična aterogena dijeta kod pacova dovodi do značajnog povećanja koncentracije ukupnog holesterola i LDL holesterola u krvi, koje korelira s antioksidacionim statusom krvi.

Hiperlipidemija i stvaranje lipidnih peroksida i drugih ROS su u međusobno povezani a samim tim je i uloga AOS u usporavanju aterogeneze značajna.

EFFECTS OF PROLONGED ATHEROGENIC DIET ON LIPID STATUS AND SOME ANTIOXIDANT PARAMETERS IN RAT BLOOD

Saško D. Velkovski¹, Verica Milošević², Snežana Ristić¹,
Slađan Paulović², Zorica S. Saičić², Vesna P. Starčević¹

¹Institute of Physiology School of Medicine, University of Belgrade,

²Institute for Biological Research »Siniša Stanković« 11000 Belgrade, Yugoslavia

Summary: In this study we measured the effects of eight-week atherogenic diet on plasma lipid status, glutathione-S-transferase activity, red blood cells-catalase activity, and glutathione and vitamin E plasma level adult male Wistar albino rats. The animals were sacrificed by decapitation 24 h after the end of the diet. Triglycerides, total cholesterol, and LDL cholesterol plasma levels, as well as LDL/HDL ratio, and vitamin E plasma level significantly raised ($p < 0,05$) after the diet in comparison with the controls. HDL cholesterol plasma level, glutathione-S-transferase and red blood cells-catalase activities, and glutathione plasma level remained unchanged ($p > 0,05$). These findings demonstrated that prolonged specific atherogenic diet in rats induced significant raise of the lipid parameters, but did not affect blood antioxidant status.

Key words: atherosclerosis, rats, lipid status, antioxidant status.

Literatura

- Majkić-Singh N. Novi biohemijski markeri oštećenja miokarda: Jugoslav Med Biohem 1999; 18: 63 75.
- Lastić-Maletić S. Patologija vaskularnog sistema. 2000; Nauka, Beograd.
- Spasić S. Menopauza, metabolizam lipida i kardiovaskularna bolest. Jugoslav Med Biohem 1999; 18: 79 83.
- Cheng S, Pallaud C, Grow MA, Scharf SJ, Erlich HA, Klitz W, et al. A multilocus genotyping assay for cardiovascular disease. Clin Chem Lab Med 1998; 36: 561 66.
- Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 1986; 232: 34 47.
- Cotgreave IA, Moldeus P, Orrenius S. Host biochemical defence mechanism against prooxidants. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1988; 28: 189 212.
- Matsuo M. Free Radicals in Aging. In: Byung PY. ed. C.R.C. London: Press, Boca Raton,. 1993.
- Gresham GA, Howard AN. The independent production of atherosclerosis and thrombosis in the rat. Brit J Exp Path 1960; 16: 395 402.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 1974; 249: 7130 9.
- Desai ID. Vitamin E analysis methods for animal tissues. Methods Enzymol 1984; 105: 138 47.
- Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Anal Biochem 1980; 106: 207 12.
- Beutler E. ed. Red Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods.. New York: Grune and Stratton, 1982: 105 6.
- Velkovski S. Efekti indobufena na trombocitnu fazu normalne i poremećene hemostaze. Magistarska teza. Beograd; Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, 1995.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoproteins that increases its atherogenicity. N Engl J Med 1989; 320: 915 24.
- Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum

- JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 3883 7.
16. Gerity RG. Role of the monocyte in atherogenesis. 1. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. Am J Pathol 1981; 103: 181 90.
 17. Geer JC, Haust MD. Smooth muscle cells in atherosclerosis. Monographs on atherosclerosis 1972; vol 12, Karger, Basel.
 18. Yu KC, Mamo JC. Chylomicron-remnant-induced foam cell formation and cytotoxicity: a possible mechanism of cell death in atherosclerosis. Clin Sci 2000; 98: 183 92.
 19. Fang X, Weintraub NL, Rios CD, Chappell DA, Zwacka RM, Engelhardt JF, Oberley LW, Yan T, Heistad DD, Spector AA. Overexpression of human superoxide dismutase inhibits oxidation of low-density lipoprotein by endothelial cells. Circ Res 1998; 82: 1289 97.
 20. Mugge A, Brandes RP, Boger RH, Dwenger A, Bode-Boger S, Kienke S, Frolich JC, Lichtlen PR. Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesterolemic rabbits. J Cardiovasc Pharmacol 1994; 24: 994 8.
 21. Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. FEBS Lett 1995; 369: 131 5.
 22. Ozer NK, Boskoinik D, Azzi A. New roles of low density lipoproteins and vitamin E in the pathogenesis of atherosclerosis. Biochem Mol Biol Int 1995; 35: 117 24.
 23. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. Cardiovasc Res 1999; 43: 562 71.
 24. Frostegard J, Wu R, Giscombe R, Holm G, Lefvert AK, Nilsson J. Induction of T-cell activation by oxidized low density lipoprotein. Arterioscler Thromb 1992; 12: 461 7.
 25. Lehr HA, Becker M, Marklund SL, Hubner C, Arfors KE, Kohlschutter A, Messmer K. Superoxide-dependent stimulation of leukocyte adhesion by oxidatively modified LDL in vivo. Arterioscler Thromb 1992; 12: 824 9.
 26. Gotoh N, Graham A, Nikl E, Darley-Usmar VM. Inhibition of glutathione synthesis increases the toxicity of oxidized low-density lipoprotein to human monocytes and macrophages. Biochem J 1993; 296: 151 4.
 27. Mori I, Yoshimura S, Watanabe K. Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase, a lipid peroxidase scavenger, in atherosclerotic lesions of human arteries. Pathol Int 1995; 45: 343 51.
 28. Spasić MB, Saičić ZS, Buzadžić B, Korać B, Blagojević D, Petrović VM. Effect of long-term exposure to cold on the antioxidant defense system in the rat. Free Rad Biol Med 1993; 15: 291 9.
 29. Jayakumari N, Ampikakumari V, Balakrishnan KG, Iyer KS. Antioxidant status in relation to free radical production during stable and unstable anginal syndromes. Atherosclerosis 1992; 94: 183 90.
 30. Halliwell B, Gutteridge JMC. eds. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. New York: Oxford University Press Inc, 1999.
 31. Žikić RV, Štajn A, Saičić ZS, Spasić MB, Milovanović SR. eds. Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja. Kragujevac, 2000: 1 150.
 32. Toborek M, Kopiczna-Grzebieniak E, Drozd M, Wieczorek M. Increased lipid peroxidation as a mechanism of methionine-induced atherosclerosis in rabbits. Atherosclerosis 1995; 115: 217 24.
 33. Godin DV, Dahiman DM. Effects of hypercholesterolemia on tissue antioxidant status in two species differing in susceptibility to atherosclerosis. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1993; 79: 151 66.

Rad primljen: 15. 8. 2001.

Prihvaćen za štampu: 26. 9. 2001.